



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ**



Curso de Pós-Graduação em Patologia Experimental

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**USO DE PCR NO DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL
CANINA: UMA ABORDAGEM COMPARATIVA DE DIFERENTES
PROTOCOLOS E TECIDOS**

MANUELA DA SILVA SOLCÀ

**Salvador – Bahia – Brasil
2012**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ**



Curso de Pós-Graduação em Patologia Experimental

**USO DE PCR NO DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL
CANINA: UMA ABORDAGEM COMPARATIVA DE DIFERENTES
PROTOCOLOS E TECIDOS**

Manuela Da Silva Solcà

Orientador: Profa. Dra. Patrícia Sampaio Tavares Veras

Co-orientador: Profa. Dra. Deborah Bittencourt Mothé Fraga

Dissertação apresentada ao Colegiado do Curso de Pós-graduação em Patologia Experimental, como pré-requisito obrigatório para obtenção do grau Mestre.

**Salvador – Bahia – Brasil
2012**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do CPqGM /FIOCRUZ
Salvador - Bahia.

S684u Solcà, Manuela da Silva
Uso de PCR no diagnóstico da leishmaniose visceral canina: uma
abordagem comparativa de diferentes protocolos e tecidos [manuscrito]. /
Manuela da Silva Solcà. - 2012.
93 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Mestrado (dissertação) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de
Medicina. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2012.

Orientador: Profª. Drª. Patrícia Sampaio Tavares Veras. Laboratório de
Patologia e Biointervenção.

1. *Leishmania*. 2. PCR. 3. Baço. 4. Cão. 5. Diagnóstico. I. Título.

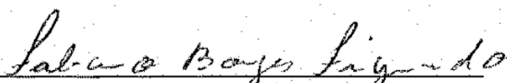
CDU 616.993.161-08

“USO DE PCR NO DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: UMA ABORDAGEM COMPARATIVA DE DIFERENTES PROTOCOLOS E TECIDOS”

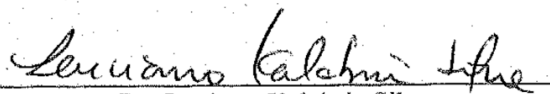
Manuela Da Silva Solcà

FOLHA DE APROVAÇÃO

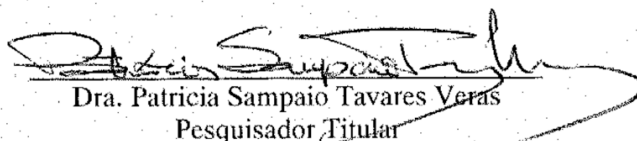
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Fabiano Borges Figueiredo
Pesquisador
IPEC/FIOCRUZ



Dr. Luciano Kalabric Silva
Tecnologista
CPqGM/FIOCRUZ



Dra. Patricia Sampaio Tavares Veras
Pesquisador Titular
CPqGM/FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos aqueles que participaram de forma direta ou indireta na realização deste trabalho:

A meus pais pelo afeto, apoio e constante incentivo em todas as fases desse projeto;

Ao meu Alexandre, pelo carinho e por estar sempre presente ao meu lado;

Às minhas orientadoras Dra. Patrícia e Dra. Deborah, pela paciência, pelo tempo dedicado me acompanhando durante essa orientação e pelos ensinamentos valiosos aprendidos na realização do projeto;

A toda a equipe do LPBI 1: Juliana, Carlos, José Geraldo, Antônio, Luana, Rodrigo, Isaac, Lairton, Marcelo, Samira, Leila, Marcos, Niara, Beatriz, Mateus, Kercia, Camila Victória, Carol, Sírio, Camila e Carla pela amizade e apoio durante a realização do trabalho;

Um obrigada particular a Carlos e Kiyoshi por compartilharem comigo seus conhecimentos em biologia molecular; a Leila e Marcelo por me ajudar no extensivo processo de extração e diluição do DNA das amostras; e a Lairton pela realização dos ELISA desse estudo;

Ao Dr. Geraldo por ceder às amostras esplênicas, sem as quais parte desse trabalho não seria possível;

Ao Dr. Washington pela ajuda nas análises dos dados e desenvolvimento do projeto;

Aos amigos e colegas do LPBI 2: Joselli, Daniela, Virgínia e Isadora pela ajuda em Jequié e no laboratório;

A Bárbara, Marcos Lázaro e Flavia MacBride pela ajuda na obtenção das diferentes amostras controle;

Aos técnicos Livia e Sergio

À administração do LPBI, em especial à Flavia pela ajuda e dedicação;

Aos amigos do curso PGPAT, pelos momentos de estudo e diversão passados juntos;

À Coordenação do curso PGPAT Fiocruz / UFBA;

Ao CNPq pela bolsa de mestrado que ajudou na realização deste projeto;

À Fiocruz e ao CPqGM, pela infraestrutura física e pessoal que possibilitaram a execução dos experimentos desta dissertação.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	06
LISTA DE TABELAS	07
LISTA DE ABREVIATURAS	08
LISTA DE SÍMBOLOS	09
RESUMO	10
ABSTRACT	11
I. INTRODUÇÃO	12
I.1. Agente etiológico	12
I.2. Patogênese	13
I.3. Manifestação Clínica da LVC	17
I.4. Diagnóstico	20
I.4.1. Técnicas Sorológicas	20
I.4.2. Exame parasitológico direto e Cultivo	22
I.4.3. Técnicas biomoleculares	23
II. JUSTIFICATIVA	31
III. OBJETIVOS	33
III.1. Objetivo Geral	33
III.2. Objetivos Específicos	33
IV. ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO	34
V. ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO	43
VI. RESUMO DE RESULTADOS	68
VII. DISCUSSÃO	69
VIII. CONCLUSÕES	74
IX. PERSPECTIVAS	75
BIBLIOGRAFIA	76
ANEXO	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de *L. infantum* no vetor invertebrado e no hospedeiro canino ----16

Figura 2. Principais sinais clínicos associados ao quadro de LVC-----19

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variação de custo dos procedimento de coleta de diferentes tecidos para o diagnóstico de LVC.....	25
Tabela 2. Custo dos principais exames diagnósticos para LVC em diferentes laboratórios, consultados no primeiro semestre de 2012.....	27
Tabela 3. Lista de artigos que utilizam a técnica de qPCR tendo como alvo o kDNA de <i>Leishmania</i> sp. em diferentes tecidos animais, comparando as diferentes metodologias e a utilização de controle interno da reação.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS

cPCR	Reação da Cadeia da Polimerase convencional (do inglês <i>convencional Polymerase Chain Reaction</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DPP	Plataforma de duplo percurso (do inglês <i>Dual Path Platform</i>)
ELISA	Ensaio imunoenzimático (do inglês <i>Enzyme Linked Immune Sorbent Assay</i>)
IgG	Imunoglobulinas G
kDNA	Ácido desoxirribonucleico do cinetoplasto (do inglês <i>kinetoplastid Deoxyribonucleic Acid</i>)
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
MS	Ministério da Saúde
n	número
ND	Não Disponível
OMS	Organização mundial da saúde (do inglês <i>World Health Organization</i>)
PCR	Reação da Cadeia da Polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
qPCR	Reação da Cadeia da Polimerase quantitativa (do inglês <i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>)
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal (do inglês <i>ribosomal Ribonucleic Acid</i>)
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
Th1	Linfócitos T auxiliares tipo 1 (do inglês <i>T helper-1</i>)
Th2	Linfócitos T auxiliares tipo 2 (do inglês <i>T helper-2</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

R\$	Real brasileiro
US\$	Dólar americano
€	Euro
fg	fentogramas
ng	nanogramas

Solcà, M. S. Uso de PCR no diagnóstico da leishmaniose visceral canina: uma abordagem comparativa de diferentes protocolos e tecidos. Salvador, 2012. (Dissertação de Mestrado em Patologia Experimental) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador.

RESUMO

No Brasil, os cães são considerados como o principal reservatório doméstico para *Leishmania infantum* (sin. *L. chagasi*). Desta forma, o diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) deve ser rápido e preciso. Este trabalho visa comparar a performance da reação em cadeia da polimerase (PCR) em detectar o DNA do parasito em diferentes tecidos para diagnóstico da LVC. Com este intuito, na primeira parte do estudo, foi padronizado um protocolo de PCR convencional (cPCR), para detecção do DNA do minicirculo do cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania* sp., em 45 fragmentos esplênicos caninos. As mesmas amostras foram avaliadas utilizando-se um protocolo de PCR quantitativa (qPCR) tendo como alvo o gene da subunidade do RNA ribossomal (SSU rRNA) de *Leishmania* sp. Também foi comparada a eficácia do diagnóstico para LVC pelas técnicas moleculares e convencionais como a cultura e o ELISA. A cPCR apresentou sensibilidade mais elevada para detecção de DNA de *Leishmania* sp. (88,9%), comparada à qPCR (83,3%). Possivelmente o melhor desempenho da cPCR foi devido ao maior número de cópias do kDNA no genoma da *Leishmania* sp. Diante dos promissores resultados apresentados pela cPCR tendo o kDNA como alvo, na segunda parte do estudo foi padronizado um novo protocolo de qPCR com este mesmo alvo, objetivando-se aumentar a sensibilidade da técnica. Foram selecionados aleatoriamente 61 cães errantes e classificados de acordo com o número de sinais clínicos associados à LVC apresentados. Todos os cães foram eutanasiados, e durante a necropsia, foram coletados fragmentos de linfonodo, aspirado esplênico, medula óssea e sangue. Também foram realizadas culturas esplênicas e ELISA. A qPCR foi empregada para a avaliação da taxa de detecção do DNA do parasito e carga parasitária nos diferentes tecidos. As diferenças entre a carga parasitária de cada tecido foram avaliadas pelo teste de Friedman ($p \leq 0,05$). Para inclusão dos tecidos nas análises dos resultados de qPCR, foi avaliada a integridade do material genético de cada amostra. Desta forma, 52 animais apresentaram resultados que atendiam aos critérios de seleção para baço, sangue e linfonodo, e destes, 24 animais também atendiam aos critérios para medula óssea. Utilizando-se a qPCR e considerando pelo menos um dos tecidos avaliados, foi detectado o DNA do parasito em todos os cães. A qPCR detectou DNA do parasito em 98,1% dos aspirados esplênicos, 80,8% das amostras sanguíneas, 53,8% dos linfonodos e 41,7% dos aspirados de medula óssea. A carga parasitária foi melhor detectada nos aspirados esplênicos, em relação ao linfonodo, nos animais oligossintomáticos e polissintomáticos ($p \leq 0,05$). O aspirado esplênico foi o tecido com maior taxa de detecção do DNA de *Leishmania* sp. pela qPCR. No entanto, não foi achada diferença estatística entre a carga parasitária do aspirado esplênico e do sangue. Desta forma, a amostra sanguínea, por ser a segunda amostra de melhor taxa de detecção, e por necessitar uma coleta menos invasiva, foi considerada como uma amostra alternativa válida para a detecção do DNA de *Leishmania* sp. em cães sintomáticos, utilizando a qPCR.

Palavras chaves: *Leishmania*, PCR, Baço, Cão, Diagnóstico

Solcà, M. S. Use of PCR for canine visceral leishmaniasis diagnosis: a comparative approach of different protocols and tissues. Salvador, 2012. (Master thesis in Experimental Pathology) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador.

ABSTRACT

Because infected dogs are widely considered to be the main domestic reservoir for *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*) parasites in Brazil, the diagnosis of canine visceral leishmaniasis (CVL) must be made both accurately and promptly. The aim of the present study was to compare the performance of the Polymerase Chain Reaction (PCR) to detect parasite DNA in different clinical sample for CVL diagnosis. For this purpose, in the first stage of the study, a conventional PCR (cPCR) protocol was standardized to detect the presence of *Leishmania* sp. kinetoplast minicircle DNA (kDNA) in 45 canine spleen fragments. The same samples were evaluated using a quantitative PCR (qPCR) technique targeting the *Leishmania* sp. sub-unit of the ribosomal RNA (SSU rRNA) gene. A comparison was made between the efficacies of these molecular diagnostic techniques and conventional parasitological and serological methods. The cPCR presented the highest sensitivity for *Leishmania* sp. DNA detection (88,9%), when compared to qPCR was (83.3%). Possibly the cPCR best performance was due to a higher copies number of the kDNA in the *Leishmania* sp. genome. Given the promising results presented by the cPCR targeting the kDNA, a new qPCR protocol with the same target was standardized in the second stage of the study, aiming increase the technique sensitivity. Sixty-one stray dogs were randomly selected and classified according to the number of clinical signs of CVL. All dogs were euthanized and lymph node fragments and splenic, bone marrow and blood aspirates were obtained during necropsies. ELISA and parasite culture of spleen aspirates were performed to confirm parasite infection. The qPCR was used to determine the parasite DNA detection rate and the parasite load in the clinical samples. Differences between parasite loads of each tissue were evaluated using Friedman test ($p \leq 0.05$). In order to include the samples in the qPCR data analysis, the DNA integrity of each sample was analyzed. This way, 52 dogs fulfilled the selection criteria for DNA results for spleen, blood and lymph nodes, with 24 of these dogs also fulfilling the criteria for bone marrow results. Using qPCR, all the 52 dogs showed positivity, considering at least one of the tissues evaluated. Positivity in qPCR was detected in 98.1% of the splenic aspirates, 80.8% of blood samples, 53.8% of lymph node fragments and 41.7% of bone marrow samples. Using qPCR, parasite DNA was better detected in splenic aspirates in comparison with lymph node in both polysymptomatic and oligosymptomatic ($p \leq 0.05$) dogs. Splenic aspirates have shown to be the tissue with highest *Leishmania* sp. DNA detection rate using qPCR, however no statistical difference was found between blood and splenic aspirate to detect. Thus, the blood sample, being the second sample with best DNA detection rate and requiring a less invasive collection, was considered a valid alternative sample for *Leishmania* sp. DNA detection in symptomatic dogs using the qPCR.

Keywords: *Leishmania*, PCR, Spleen, Dog, Diagnostic

I. INTRODUÇÃO

I.1. Agente etiológico

As leishmanioses são causadas por protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* (MAURICIO *et al.*, 1999). Essas doenças podem acometer humanos, animais domésticos e silvestres (LAINSON e SHAW, 1978; KUHLS *et al.*, 2011). Nas Américas, a leishmaniose visceral (LV) é causada pela espécie *Leishmania infantum* (sin. *Leishmania chagasi*). Estudos recentes de caracterização molecular mostraram que *L. chagasi* e *L. infantum* são indistinguíveis geneticamente podendo uma espécie ser citada como sinônimo da outra (MAURICIO, STOTHARD e MILES, 2000; KUHLS *et al.*, 2011). De maneira esporádica, foi constatado que alguns casos de LV são causados pela espécie *Leishmania amazonensis* (BARRAL *et al.*, 1991; ALEIXO *et al.*, 2006). Estes protozoários são transmitidos aos mamíferos pela picada de fêmeas de insetos hematófagos pertencentes à família Psychodidae (NEVES, 2006; ROMICH, 2008). O *Lutzomyia longipalpis* é considerado o principal vetor biológico da LV no Brasil (SHERLOCK, 1996; MONTEIRO *et al.*, 2005).

A LV humana é caracterizada por evolução crônica e sistêmica, quando não tratada, esta enfermidade resulta em morte de 90% dos casos (MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2008). Estima-se que, anualmente, a LV seja a causa de 59.000 mortes no mundo, uma taxa que é superada, entre as doenças parasitárias, somente pela malária (WHO, 2002). Existem relatos de casos de LV em 88 países, contudo, 90% dos casos ocorrem predominantemente em 5 nações: Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil (DESJEUX, 2004). No Brasil, atualmente, a LV é considerada, como um sério problema de saúde pública, por estar amplamente disseminada no território nacional (SINAN/SVS/MS, 2011). Em 2009, esta zoonose foi detectada em 21 das 27 Unidades Federativas, atingindo todas as cinco regiões brasileiras (SINAN/SVS/MS, 2011). Em algumas regiões do globo, o cão é considerado o principal reservatório da doença, podendo apresentar manifestações de leishmaniose visceral canina (LVC) (DEANE e DEANE, 1955; PARANHOS-SILVA *et al.*, 1996). Segundo Alvar *et al.* (2004), a LVC está presente em cerca de 50 dos 88 países afetados pela LV, sendo os três maiores focos: a bacia do Mediterrâneo, a China e a América do Sul.

As evidências que apontam o papel do cão como principal reservatório da LV nas áreas urbanas consistem em: presença de elevado parasitismo na pele de cães que pode funcionar como fonte de infecção para o vetor, e relatos da ocorrência de enzootia canina, precedendo a infecção humana (MOLINA *et al.*, 1994; BEVILACQUA *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2001; ALVAR *et al.*, 2004; BRASIL, 2006; MARGONARI *et al.*, 2006; MADEIRA *et al.*, 2009). Diante desses fatos, uma das principais medidas de controle da LV preconizada pelo Ministério da Saúde (MS) consiste em identificar e eliminar (eutanasiar) os animais sorologicamente positivos (BRASIL, 2006).

I.2. Patogênese

L. infantum é um protozoário bifásico, que se apresenta em duas formas distintas durante seu ciclo de vida (ALEXANDER e RUSSELL, 1992). No interior do trato digestório dos vetores flebotomíneos, os hospedeiros invertebrados, o parasito encontra-se na forma de promastigota (KILLICK KENDRICK e RIOUX, 1991). Enquanto que, no hospedeiro vertebrado prevalece a forma intracelular obrigatória, amastigota, encontrada no fagolisossomo de células do sistema fagocítico mononuclear (ANTOINE *et al.*, 1990; ALEXANDER, SATOSKAR e RUSSELL, 1999; KAYE e SCOTT, 2011).

O ciclo biológico da LV se inicia com os insetos vetores infectando-se ao alimentarem-se do sangue de algum hospedeiro vertebrado infectado (NEVES, 2006; ROMICH, 2008). Na pele do hospedeiro vertebrado, encontram-se macrófagos albergando formas amastigotas do parasito do gênero *Leishmania* sp. (KILLICK-KENDRICK, 1999). Uma vez no tubo digestório dos insetos, as formas amastigotas transformam-se em formas promastigotas e passam a expressar em sua superfície uma camada de moléculas como lipofosfoglicanos e glicoconjugados, capazes de proteger o parasito da ação das enzimas hidrolíticas presentes no intestino do flebotomíneo (RUSSELL e WRIGHT, 1988; TALAMAS-ROHANA *et al.*, 1990; ALEXANDER e RUSSELL, 1992). Durante o repasto sanguíneo, a fêmea do flebotomíneo infectada, inocula na derme do hospedeiro vertebrado promastigotas metacíclicas, que são as formas infectivas do parasito (KILLICK-KENDRICK, 1999).

Na derme, os parasitos são fagocitados pelos macrófagos. No interior do macrófago a forma promastigota perde o flagelo, sendo capaz de se adaptar às condições do

vacúolo parasitóforo (Figura 1) (KAYE e SCOTT, 2011). No interior desses compartimentos fagolisossomais ácidos e ricos em enzimas hidrolíticas, as promastigotas se transformam na forma amastigota (NEVES, 2006; ROMICH, 2008). As formas amastigotas se multiplicam intensamente por divisão binária simples levando à lise do macrófago, e uma vez liberadas, as amastigotas poderão ser novamente fagocitadas por outras células do sistema retículo endotelial (NEVES, 2006; REY, 2008).

Uma vez que as formas promastigotas são inoculadas na derme do cão, a infecção pode ser: limitada, sendo controlada localmente pelos macrófagos; não disseminada, quando os parasitos conseguem instalar-se apenas na pele e nos linfonodos, caracterizando um quadro de infecção assintomática; ou ainda disseminada, em caso de falha na resposta imune do hospedeiro, onde os parasitos espalham-se por todo o organismo levando ao aparecimento da doença sintomática (BANETH *et al.*, 2008; SARIDOMICHELAKIS, 2009; SOLANO-GALLEGU *et al.*, 2011). A distribuição sistêmica dos parasitos é extensa na LVC. Após a picada do inseto vetor o parasito se distribui rapidamente nos linfonodos e baço, sucessivamente ele alcança os rins e o fígado (MOREIRA *et al.*, 2007). Finalmente, o parasito se dissemina para os órgãos reprodutivos, pele, bexiga, trato digestório e respiratório (MOLYNEUX e ASHFORD, 1983).

O desenvolvimento da infecção no cão está relacionado a fatores ligados ao parasito, como à capacidade de resistir ao efeito microbicida dos macrófagos ativados, assim como a fatores ligados ao hospedeiro, tais como, predisposição genética e tipo de resposta imune (GRIMALDI e TESH, 1993). Adicionalmente, fatores associados ao vetor podem ter reflexo sobre o curso da infecção, como exposição contínua à saliva devido a repetidas picadas do inseto vetor (COURTENAY *et al.*, 2002; MORENO e ALVAR, 2002). A susceptibilidade ou resistência à LVC está intimamente ligada ao tipo de resposta imune desenvolvida pelo animal, o perfil de resistência está associado à predominância de resposta imune celular (Th1), enquanto cães susceptíveis apresentam uma acentuada resposta humoral (Th2) (PINELLI *et al.*, 1994; SOLANO-GALLEGU *et al.*, 2000). Foi demonstrado que na transição do estado assintomático para aparecimento de sintomas, ocorre supressão da resposta proliferativa de linfócitos (MORENO *et al.*, 1999; RHALEM *et al.*, 1999). Desta forma, na ausência de resposta imune celular, pode ocorrer progressão para o desenvolvimento da doença (RHALEM *et al.*, 1999; LEANDRO *et al.*, 2001). Existem

evidências de correlação positiva entre sintomatologia manifestada por cães naturalmente infectados, níveis de citocinas produzidas e carga parasitária (MANNA *et al.*, 2006).

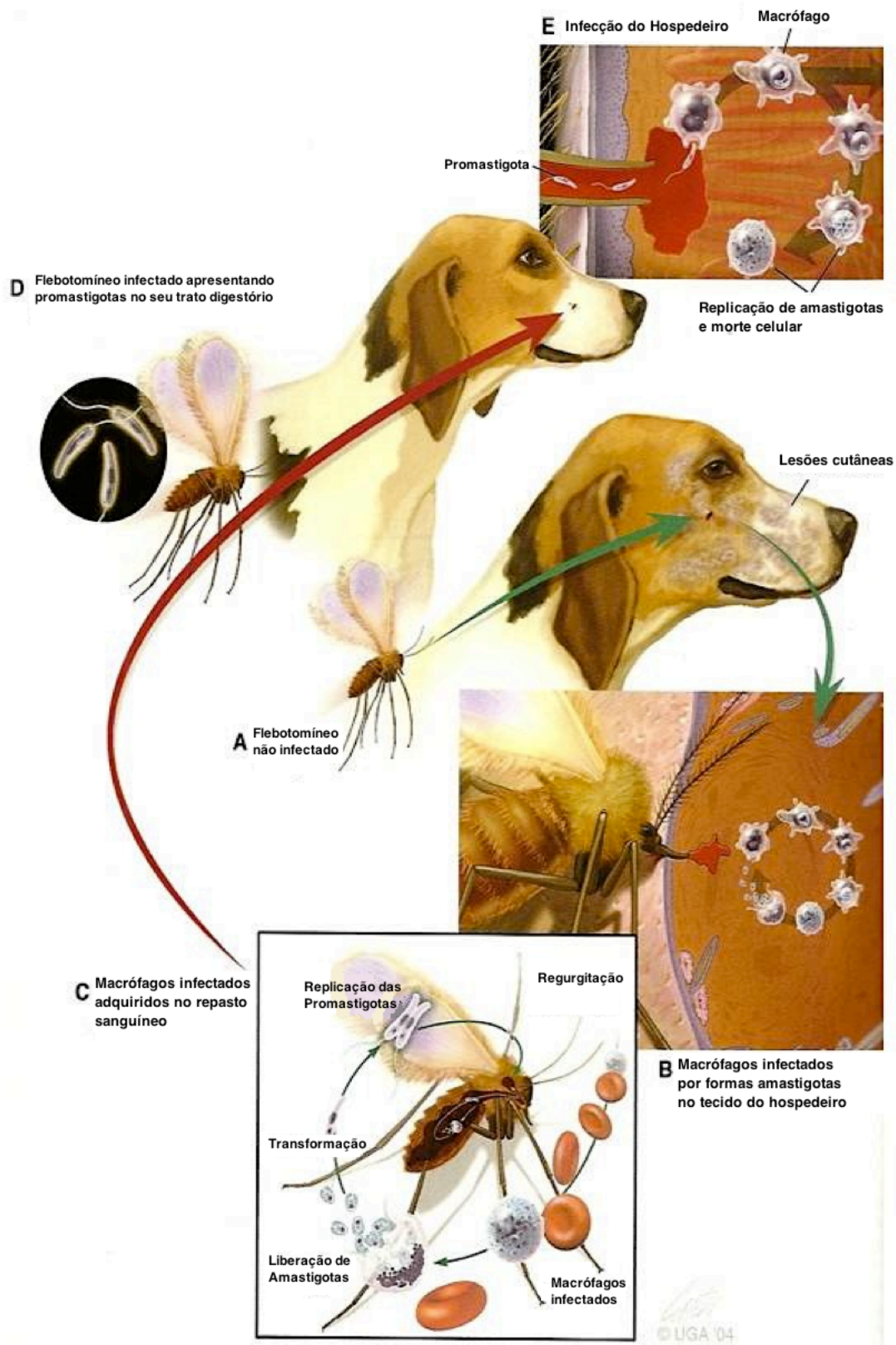


Figura 1. Ciclo biológico de *L. infantum* no vetor invertebrado e no hospedeiro canino; **A:** fêmea de flebótomo se alimenta de um hospedeiro infectado; **B:** o inseto ingere macrófagos albergando *L. infantum* do tecido do hospedeiro; **C:** as formas amastigotas dos parasitos deixam os macrófagos no trato digestório do inseto; **D:** no trato digestório do inseto os parasitos se tornam formas promastigotas móveis e passam a se replicar; **E:** as formas promastigotas são regurgitadas durante o repasto sanguíneo podendo infectar um novo hospedeiro. Figura modificada de Greene 2006.

I.3. Manifestação Clínica da LVC

Cães considerados resistentes conseguem eliminar efetivamente os parasitos intracelulares no local da infecção e permanecer clinicamente normais (assintomáticos) (CABRAL, O'GRADY e ALEXANDER, 1992; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2000). Já os animais susceptíveis, apresentam no tecido infectado, um grande número de parasitos, podendo ocorrer invasão de múltiplos órgãos por inflamação granulomatosa e mecanismos imunomediados levando ao aparecimento de diferentes tipos de sinais (SARIDOMICHELAKIS, 2009; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009).

Os sinais clínicos iniciais da LVC compreendem: hipertrofia dos linfonodos, onicogribose, edema dos coxins plantares, alopecia localizada e dermatite periocular e nasal, estas últimas podem rapidamente disseminar-se para outras regiões do corpo do animal (GREENE, 2006). Febre, apatia, diarreia, epistaxe, hemorragia intestinal, perda de peso, inapetência, hepatoesplenomegalia, hiperqueratose, ulcerações cutâneas; ceratoconjuntivite também são achados nos animais acometidos (CIARAMELLA *et al.*, 1997; KOUTINAS *et al.*, 1999; MENDONÇA *et al.*, 1999). Em cerca de 60 a 90% dos cães sintomáticos para LVC são detectadas lesões cutâneas (KOUTINAS *et al.*, 1999; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001a; GREENE, 2006; SHAW, LANGTON e HILLMAN, 2009). Dentre as lesões cutâneas mais comuns nos animais estão: dermatite não pruriginosa esfoliativa, com ou sem alopecia, que pode ser generalizada ou localizada no focinho, orelhas e membros (FERRER *et al.*, 1988; KOUTINAS *et al.*, 1999; ORDEIX *et al.*, 2005). A Figura 2 ilustra cães apresentando sinais frequentemente associados à LVC.

Quadros severos de LVC se caracterizam principalmente por sinais típicos como ulcerações cutâneas disseminadas pelo corpo, cegueira, anorexia, caquexia, onicogribose, dermatite, alopecia generalizada, levando o animal à morte (ALVAR *et al.*, 2004). O envolvimento renal na LVC é frequente, principalmente devido ao acúmulo de imunocomplexos que causam lesão glomerular (BENDERITTER *et al.*, 1988; COSTA *et al.*, 2003). Sendo a lesão renal considerada a principal causa de mortalidade da LVC (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011).

Mancianti *et al.* (1988), classificaram os cães infectados por LVC de acordo com os sinais clínicos apresentados em: assintomáticos (sem sinais clínicos), oligossintomáticos (um a três sinais clínicos) ou polissintomáticos (aqueles que apresentam mais de três sinais

clínicos característicos). Todavia, recentemente, a classificação de Mancianti *et al.* (1988) sofreu algumas críticas por levar em conta apenas disfunções aparentes e não considerar alterações clinico-patológicas, como anemia, plaquetopenia, alterações renais e hepáticas (BANETH *et al.*, 2008). Os principais achados laboratoriais bioquímicos na LVC são hiperglobulinemia, principalmente devido à elevada produção de anticorpos e hipoalbuminemia, atribuída à inflamação crônica, lesões renais, hepáticas e intestinais (CIARAMELLA *et al.*, 1997; KOUTINAS *et al.*, 1999; ALMEIDA *et al.*, 2005). O resultado destas alterações é uma redução da relação albumina/globulina e hiperproteinemia (ALMEIDA *et al.*, 2005). O quadro de LVC severa é associado a parâmetros hematológicos como marcada anemia e leucopenia, caracterizada por linfopenia, eosinopenia e monocitopenia (CIARAMELLA *et al.*, 1997; REIS *et al.*, 2006; TROPÍIA DE ABREU *et al.*, 2011). Trombocitopenia imunomediada também é relatada, sendo responsável por episódios de epistaxe, hematúria e diarreia hemorrágica (CORTESE *et al.*, 2009).



Figura 2. Principais sinais clínicos associados ao quadro de LVC; **A:** alopecia no focinho; **B:** dermatite periocular com hiperqueratose; **C:** hiperqueratose da mucosa nasal; **D:** dermatite não pruriginosa esfoliativa generalizada; **E:** lesão ulcerada em orelha; **F:** crosta com lesão vascular em ponta de orelha; **G:** linfadenomegalia do linfonodo poplíteo; **H:** caquexia; **I:** onicogrifose. Fotos do acervo pessoal e do Laboratório de Patologia e Biointervenção (LPBI – CPqGM) de animais infectados por *L. infantum*.

I.4. Diagnóstico

O diagnóstico da LVC é muitas vezes presumido pela identificação de manifestações clínicas características, no entanto, este deve ser confirmado pela demonstração do parasito utilizando-se técnicas laboratoriais (GRIMALDI e TESH, 1993). Todavia, vale salientar que, embora exista uma grande variedade de técnicas diagnósticas para LVC, nenhuma apresenta 100% de sensibilidade e especificidade (GONTIJO e MELO, 2004).

As técnicas sorológicas, como o ensaio imunoenzimático (ELISA) e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) são os métodos mais empregados para o diagnóstico da LVC (ALVES e BEVILACQUA, 2004). Até o presente, segundo instrução do MS, os inquéritos caninos para triagem e identificação dos animais soropositivos para LVC eram realizados utilizando a técnica de ELISA, seguida pela RIFI para confirmação da infecção (BRASIL, 2006). No entanto, recentemente, uma nova instrução normativa foi emitida pelo MS, indicando o uso do teste rápido *dual path platform* (DPP) para triagem dos animais, e o ELISA como exame confirmatório, eliminando a RIFI da rotina diagnóstica (BRASIL, 2011). A implantação do teste rápido DPP está sendo realizada gradativamente em todo o território nacional, abrangendo todos os estados brasileiros, até o final de 2012 (BRASIL, 2011).

Os métodos parasitológicos como o exame direto de lâminas e o isolamento por cultura de tecidos, permitem a detecção do parasito, e podem ser empregados como métodos diagnósticos confirmatórios para LVC (BARROUIN-MELO *et al.*, 2004). Nas últimas décadas, as técnicas moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR), foram introduzidas para o diagnóstico da LVC, apresentando elevada sensibilidade e especificidade (MIRÓ *et al.*, 2008). Estas técnicas detectam o material genético do parasito, podendo ser empregadas como métodos confirmatórios em caso de animais recém infectados ou assintomáticos que, na maioria dos casos, não apresentam soroconversão e apresentam baixa carga parasitária (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001a; ALVES e BEVILACQUA, 2004).

I.4.1. Técnicas sorológicas

O ELISA e a RIFI são métodos diagnósticos geralmente realizados coletando-se eluato de sangue em papel de filtro (BRASIL, 2006). Esses testes permitem a detecção de

imunoglobulinas G (IgG) no soro, podendo ser utilizados para diagnóstico de indivíduos infectados, assim como em estudos de prevalência (GOMES *et al.*, 2008).

O ELISA detecta IgG para LVC em uma reação realizada em placa, enquanto que a RIFI utiliza formas promastigotas do parasito fixadas em lâminas (BRASIL, 2006). A vantagem do ELISA consiste no fato de ser uma técnica objetiva, uma vez que seu resultado é dependente da densidade óptica produzida pela reação e lida em um aparelho de espectrofotometria. Já na RIFI, a leitura dos resultados é realizada em um microscópio de fluorescência, dependendo da capacidade do observador em detectar os imunocomplexos formados.

Por diversas razões, esses métodos não mostram resultados satisfatórios: i) são produzidos utilizando-se como antígeno o protozoário inteiro ou o extrato do parasito (KAR, 1995; SUNDAR e RAI, 2002; SILVA *et al.*, 2011); ii) o teste comercial de ELISA é produzido com antígenos extraídos de *L. major* e não *L. infantum* (DA SILVA *et al.*, 2009); iii) apresentam reação cruzada com diversos outros patógenos como *Toxoplasma gondii*, *Ehrlichia canis*, e parasitos da família *Trypanosomatidae* como *Trypanosoma cruzi* e outras espécies de *Leishmania* (FERREIRA *et al.*, 2007; TRONCARELLI *et al.*, 2009); iv) apresentam baixa reprodutibilidade; pelo uso de diferentes lotes de isolados de *Leishmania* sp., que são cultivados, em momentos diferentes, podendo exibir composição antigênica distintas entre si (NOLAN e HERMAN, 1985). Desta forma, o resultado destes testes sorológicos deve ser sempre avaliado com cuidado, procurando sempre associá-lo ao histórico epidemiológico, quadro clínico apresentado pelo animal e, se possível, ao resultado de outro teste diagnóstico mais específico (DA SILVA *et al.*, 2006). Entretanto, a identificação de proteínas de *Leishmania* sp. que atuam como antígenos alvos, para a ligação de anticorpos específicos detectáveis nos testes sorológicos, têm conseguido melhorar a sensibilidade e especificidade destas técnicas (SINGH, KUMARI e SINGH, 2002; FERREIRA *et al.*, 2007).

Além do ELISA e RIFI, os testes imunocromatográficos vem sendo empregados para o diagnóstico da LVC utilizando proteínas recombinantes como a rk39 de *L. infantum* (SINGH, KUMARI e SINGH, 2002; DOURADO *et al.*, 2007). Testes rápidos utilizando rK39, quando empregados para o diagnóstico da LVC, podem apresentar sensibilidade e especificidade que variam de 70,9-84% e 84,9-95%, respectivamente, a depender do quadro clínico apresentado pelo animal (MOHEBALI, TARAN e ZAREI, 2004; LEMOS *et al.*, 2008). A diferença de performance destes testes, pode estar relacionada com o elevado grau

de variabilidade nas respostas humorais observadas em cães infectados por *Leishmania* sp. (PORROZZI *et al.*, 2007). Desta forma, o diagnóstico eficiente de LVC pode exigir uma mistura de proteínas recombinantes ou a utilização de proteínas quiméricas que contenham uma proteína híbrida com epítomos de antígenos do parasito (COSTA *et al.*, 2012). O novo teste rápido DPP é composto pelas proteínas recombinantes k26 e k39, representativas de regiões antigênicas da *L. infantum* (BRASIL, 2011).

Um estudo de Grimaldi *et al.* (2012) utilizando o teste rápido DPP demonstrou elevada especificidade (96%) e baixa sensibilidade (47%) na identificação de cães assintomáticos infectados, no entanto, a sensibilidade do teste é significativamente maior (98%) para detecção de animais sintomáticos. A adoção deste novo método se deve ao resultado de estudos comparativos da acurácia da combinação ELISA-RIFI e do teste rápido DPP-ELISA, onde o protocolo de implantação mostrou que o teste rápido DPP, utilizando como teste confirmatório o ELISA, além de apresentar melhor acurácia, também demonstrou melhor reprodutibilidade entre os laboratórios em relação ao ELISA-RIFI (BRASIL, 2011). Outra vantagem do emprego desses testes consiste na falta de necessidade da estrutura laboratorial e equipamentos, facilitando o seu uso no campo (GRIMALDI *et al.*, 2012). Além de diminuir o tempo necessário para o diagnóstico, oferecendo o resultado em cerca de 15 minutos (DE LIMA *et al.*, 2010).

I.4.2. Exame parasitológico direto e cultivo

A observação de formas amastigotas ou promastigotas em material obtido de punção de medula óssea, baço ou de outros tecidos consiste no diagnóstico laboratorial definitivo da LV em humanos e caninos (BARROUIN-MELO *et al.*, 2004; REIS *et al.*, 2006). Assim, as técnicas que permitem essa confirmação são definidas como padrão-ouro (do inglês *gold standard*) (DOURADO *et al.*, 2007; GOMES *et al.*, 2008). A visualização direta de amastigotas no tecido é feita em lâmina, utilizando-se colorações como Giemsa ou Romanowsky (ALVAR *et al.*, 2004). Contudo, apesar da especificidade dos métodos parasitológicos ser muito elevada, a sensibilidade destas técnicas é baixa, principalmente na detecção de cães pouco parasitados, recém infectados ou assintomáticos (PINELLI *et al.*, 1994; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001a).

O cultivo de tecidos permite a observação do crescimento de formas promastigotas de *Leishmania* sp., em tecidos infectados, sendo os meios mais utilizados o Novy–McNeal–Nicolle (NNN) e o Schneider (BARROUIN-MELO *et al.*, 2004). Esta técnica apresenta maior sensibilidade quando comparada à visualização direta de amastigotas no tecido (MAIA e CAMPINO, 2008). Adicionalmente, a cultura torna possível o isolamento dos parasitos e sua caracterização, podendo determinar quais espécies e/ou variantes circulam em áreas endêmicas (DE ALMEIDA *et al.*, 2011).

Em culturas positivas, as formas promastigotas podem ser visualizadas já na primeira semana de cultivo, no entanto, para se determinar que uma cultura é negativa, são necessárias pelo menos 4 semanas de observação (ALVAR *et al.*, 2004; DE ALMEIDA *et al.*, 2011). Logo, a cultura do parasito é uma técnica trabalhosa e demorada, que depende da experiência do observador para que o diagnóstico correto (MOREIRA *et al.*, 2007; NDAO, 2009). Adicionalmente, a sensibilidade da cultura pode ser prejudicada pela falha de refrigeração no transporte da amostra, ou contaminação da mesma durante a coleta, ambos resultando em morte do parasito. Ainda, os meios específicos para o isolamento de promastigotas não são de fácil obtenção, sendo uma técnica restrita a laboratórios especializados (PALTRINIERI *et al.*, 2010; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011).

I.4.3. Técnicas biomoleculares

O emprego de técnicas biomoleculares como a reação em cadeia da polimerase convencional (cPCR) e a PCR em tempo real ou quantitativa (qPCR), para o diagnóstico da LVC, demonstrou elevada sensibilidade e especificidade, superando resultados obtidos pelas técnicas de ELISA, RIFI e cultura na detecção de animais infectados por *Leishmania* sp. (REALE *et al.*, 1999; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001a; MIRÓ *et al.*, 2008).

O método da PCR consiste inicialmente na identificação de uma região do DNA do parasito, denominada alvo, para o desenvolvimento de oligonucleotídeos iniciadores que, em condições ideais de temperatura e pH, hibridizam-se especificamente na região escolhida, levando à amplificação exponencial deste fragmento (SUNDAR e RAI, 2002; PAIVA-CAVALCANTI, REGIS-DA-SILVA e GOMES, 2010). A cPCR é uma técnica qualitativa, sendo uma das grandes desvantagens desta técnica a necessidade de eletroforese em gel de

agarose ou poliacrilamida, para visualização do produto amplificado (REITHINGER e DUJARDIN, 2007).

Por sua vez, a qPCR é uma técnica quantitativa, com capacidade de monitorar e quantificar a amplificação do produto, utilizando corantes ou sondas fluorescentes, enquanto a reação progride (PAIVA-CAVALCANTI, REGIS-DA-SILVA e GOMES, 2010). Um corante amplamente utilizado é o SYBR Green (Applied Biosystems, CA, USA), que se liga de forma não específica nas sequências de DNA de fita dupla, geradas durante a amplificação (REITHINGER e DUJARDIN, 2007). Já o sistema TaqMan (Applied Biosystems, CA, USA), consiste em uma sonda que se liga especificamente à sequência alvo, e que, quando consumida durante a amplificação do produto, emite uma fluorescência específica; o uso desta sonda aumenta a especificidade da técnica (REITHINGER e DUJARDIN, 2007).

A detecção de DNA de *Leishmania* sp. pelas técnicas de PCR pode ser realizada em uma ampla variedade de amostras clínicas (FISA *et al.*, 2001; MANNA *et al.*, 2004; FRANCINO *et al.*, 2006; MAIA *et al.*, 2009; GALLETTI *et al.*, 2011). Manna *et al.* (2004), avaliaram através da técnica de cPCR diferentes tecidos de cães naturalmente infectados, obtendo elevada especificidade e sensibilidade: em 99% das amostras de linfonodos, 95% das biópsias de pele e 94% das amostras de sangue foi possível a detecção do DNA parasito. Um inquérito realizado por Maia *et al.* (2009) em cachorros com diferentes quadros clínicos, demonstrou que o uso de aspirado de linfonodos para técnica de cPCR é ideal para o diagnóstico precoce da LVC em cachorros sintomáticos. Todavia, em caso de ausência de linfadenomegalia, é indicado o emprego de aspirados e medula óssea, pois esta apresenta uma maior carga parasitária em relação aos linfonodos (QUARESMA *et al.*, 2009).

Reis *et al.* (2006) em um estudo citológico, demonstraram que o baço é um dos principais órgãos onde a densidade parasitária encontra-se elevada durante todo o curso da LVC, tanto em cães assintomáticos como sintomáticos. Saldarriaga *et al.* (2006) demonstraram em um estudo de infecção experimental intradérmica com promastigotas de *Leishmania* sp. em cães, que 96 horas após o inóculo, o parasito já foi encontrado em linfonodos e baço dos animais. Um outro estudo revelou graus variáveis de esplenomegalia na maioria dos cães infectados por *Leishmania* sp. (BARROUIN-MELO *et al.*, 2006). Estes achados fazem do baço um tecido importante e interessante para o diagnóstico da LVC empregando-se as técnicas biomoleculares (MAIA *et al.*, 2009). Apesar disso, a obtenção de amostras esplênicas, mesmo sendo bem tolerada pelo animal, pode acarretar o risco de lesões

internas, como hemorragias (LÉVEILLÉ *et al.*, 1993). No entanto, em um estudo de Barrouin-Melo *et al.* (2006) no qual foram realizadas mais de 257 punções esplênicas, somente 2 animais tiveram alça intestinal aspirada e um animal apresentou hemorragia no local da punção. Estes riscos podem ser minimizados utilizando-se aparelho de ultrassom que pela visualização do órgão, permite a realização de uma coleta guiada e segura (WATSON *et al.*, 2011).

A medula óssea é considerada o maior órgão hematopoiético e um dos principais tecidos linfoides, sendo considerada um local importante de armazenamento de *Leishmania* sp. em cães infectados (TROPICIA DE ABREU *et al.*, 2011). Os linfonodos por serem também tecidos linfoides estão incluídos dentre os órgãos onde é mais frequente a detecção do parasito (MARZOCHI *et al.*, 1985). Contudo, assim como a coleta esplênica, a obtenção de aspirados de medula óssea e de linfonodos são considerados procedimentos invasivos (CARVALHO *et al.*, 2009). Desta forma, é recomendável a utilização de amostras obtidas de forma menos invasiva, como sangue e esfregaços conjuntivais (AOUN *et al.*, 2009; DE ALMEIDA FERREIRA *et al.*, 2012; LOMBARDO *et al.*, 2012). Essas amostras são de obtenção fácil, rápida, e de baixo custo quando comparadas às mais invasivas (Tabela 1), além de serem bem aceitas pelos proprietários dos animais (AOUN *et al.*, 2009; MAIA *et al.*, 2009; DE ALMEIDA FERREIRA *et al.*, 2012).

Tabela 1. Variação de custo dos procedimento de coleta dos diferentes tecidos para o diagnóstico de LVC

Procedimento	Custo em €*
Coleta de sangue	7,20 – 8,50
Coleta de linfonodo ou medula óssea	13,00 – 17,50

* €1 = aprox. US\$ 1,38

Tabela modificada de Maia *et al.*, 2009

Alguns estudos evidenciaram que a detecção do parasito em sangue periférico é menos sensível, quando comparada com outras amostras de tecidos como baço, medula óssea, pele e linfonodos (REALE *et al.*, 1999; FISA *et al.*, 2001). No entanto, Francino *et al.* (2006), demonstraram que pela elevada capacidade da qPCR em identificar DNA do parasito, o sangue pode ser empregado para o diagnóstico de infecção por *Leishmania* sp., mesmo apresentando uma baixa carga parasitária.

Utilizando-se esfregaços conjuntivais, Strauss-Ayali *et al.* (2004) conseguiram detectar pela técnica da cPCR 92% dos animais sintomáticos avaliados no estudo. Lombardo *et al.* (2011) pela técnica de qPCR em esfregaços conjuntivais, obtiveram resultados similares àqueles obtidos com amostras mais invasivas como aspirados de linfonodo. Leite *et al.* (2010) também conseguiram detectar o DNA do parasito a partir de esfregaços conjuntivais de animais assintomáticos pela técnica da cPCR seguida por hibridização. Dentre outras amostras menos invasivas investigadas, Solano-Gallego *et al.* (2007) avaliaram amostras de urina pela técnica de qPCR, contudo os resultados descritos mostraram positividade somente em cães com lesão renal severa. Naranjo *et al.* (2011) demonstraram a presença do DNA de *Leishmania* sp. pela qPCR em glândulas lacrimais de cães infectados, obtendo correlação entre positividade e presença de lesão ocular.

Atualmente, o elevado custo da qPCR ainda constitui-se um entrave para seu uso rotineiro (Tabela 2). No entanto, esse método apresenta vantagens objetivas sobre a cPCR (MOREIRA *et al.*, 2007; MAIA *et al.*, 2009). Particularmente devido à possibilidade de quantificação do DNA alvo, permitindo monitorar a carga parasitária do animal no decorrer de infecção experimental, ou após tratamento, em países onde este é permitido (PENNISI *et al.*, 2005; MAIA e CAMPINO, 2008; MANNA *et al.*, 2008; MARTINEZ *et al.*, 2011). Também na qPCR há redução da probabilidade de contaminação e rapidez da reação, uma vez que não é realizada eletroforese para visualização dos resultados (ROLÃO *et al.*, 2004; PAIVA-CAVALCANTI, REGIS-DA-SILVA e GOMES, 2010).

Tabela 2. Custo dos principais testes diagnósticos para LVC, em diferentes laboratórios consultados no primeiro semestre de 2012

Laboratório – País	Preço dos testes diagnóstico para LVC em R\$				
	Citologia	ELISA	cPCR	qPCR	qPCR e Citologia
Elleviti – Torino, Itália	---	49.30*	115.80*	---	---
Scanelis - Toulouse, França	---	---	---	106.00*	---
Laboratoire d'Anatomie Pathologique Vétérinaire du Sud-Ouest – Toulouse, França	---	---	---	---	178.50
Texas Veterinary Medical Diagnostic Laboratory – San Antonio TX, EUA	---	45.00*	---	---	---
Cornell University - Ithaca NY, EUA	---	37.50*	112.60*	---	---
Hermes Pardini - Belo Horizonte MG, Brasil	25.00	40.00	168.00	---	---
Laborlife - Rio de Janeiro RJ, Brasil	---	50.00	180.00	---	---

* Preços em Euros e Dólares convertidos em reais em 20 de abril de 2012
 €1 = aprox. R\$ 2,47; US\$1 = aprox. R\$ 1,70

A sensibilidade das técnicas de PCR para detecção de *Leishmania* sp. depende de vários fatores: as condições físico-químicas da reação, a concentração e a natureza do DNA da amostra e os iniciadores e sondas selecionados para a região alvo (BASTIEN, PROCOP e REISCHL, 2008). As regiões alvo mais frequentemente empregadas tendem a ser altamente conservadas e repetitivas como o gene da subunidade do RNA ribossomal (rRNA) ou o DNA do minicírculo do cinetoplasto (kDNA) (SUNDAR e RAI, 2002; ANTINORI *et al.*, 2007; BASTIEN, PROCOP e REISCHL, 2008; MIRÓ *et al.*, 2008). Enquanto o gene rRNA está presente em 40-200 cópias por célula, o minicírculo do kDNA está presente em 10.000 cópias, que encontram-se distribuídas entre 10 classes de sequências diferentes, conferindo uma elevada sensibilidade às PCR que utilizam esta região como alvo (LACHAUD *et al.*, 2002).

Nos últimos anos, diversos métodos de qPCR foram desenvolvidos para a detecção do parasito e o diagnóstico da LVC. No entanto, as metodologias empregadas variaram consideravelmente entre si, comprometendo a validade dos resultados obtidos. Essas variações dependem de alguns fatores: falta de normalização da amplificação do gene do parasito em relação ao gene constitutivo do mamífero, falta de padronização na determinação da sensibilidade e da carga parasitária dos tecidos de animais infectados (BASTIEN, PROCOP e REISCHL, 2008). Uma lista de trabalhos elencando a metodologia empregada e o resultado obtido pela técnica de qPCR em diferentes tecidos, está representada na Tabela 3.

Tabela 3. Lista de trabalhos que utilizam a técnica de qPCR tendo como alvo o kDNA de *Leishmania* sp. em diferentes tecidos caninos, comparando as diferentes metodologias e a utilização de controle interno da reação

Autor e Ano	qPCR		Controle interno			Amostra		Resultado	
	Método	Limite de Detecção	Inibição	Normalização	Gene	(n)	Tecidos	Tipo de estudo*	Sensibilidade**
Pennisi <i>et al.</i> 2005	ND	ND	Não	Não	---	(6) Cães tratados	Linfonodo, Pele e Sangue	Não comparativo	---
Francino <i>et al.</i> 2006	TaqMan	0.001 parasitos / reação	Sim	Não	RNA18S Eucariótico	(15) Cães com sinais sugestivos para LVC	Medula óssea e Sangue	Comparativo ^{1,2}	Medula óssea > Sangue ☐
Rodriguez-Cortez <i>et al.</i> 2007	TaqMan	0.001 parasitos / reação	Sim	Sim	RNA18S Eucariótico	(6) Cães infectados experimentalmente	Baço, Fígado, Linfonodo, Medula óssea, Pele e Sangue	Não comparativo	---
Solano-Gallego <i>et al.</i> 2007	Syber	7 parasitos / ml	Sim	Não	GAPDH cão	(10) Cães sintomáticos infectados naturalmente	Medula óssea, Sangue e Urina	Comparativo ²	Medula óssea > Sangue > Urina ☐
Manna <i>et al.</i> 2008	TaqMan	0.001 parasitos / ml	Sim	Sim	β -actina	(18) Cães infectados naturalmente tratados	Linfonodo, Pele e Sangue	Comparativo ²	Linfonodo > Pele > Sangue ☐
Manna <i>et al.</i> 2009	TaqMan	ND	Sim	Sim	β -actina	(56) Cães	Linfonodo e Sangue	Não comparativo	---

* Tipo de estudo: Comparativo¹: compara o resultado das técnicas diagnósticas; Comparativo²: compara o resultado dos tecidos; ** Sensibilidade: avaliação da detecção de *Leishmania* sp. nos diferentes tecidos; ☐: Não estatisticamente significativo; ND: Não disponível

Autor e Ano	qPCR		Controle interno			Amostra		Resultado	
	Método	Limite de Detecção	Inibição	Normalização	Gene	(n)	Tecidos	Tipo de estudo*	Sensibilidade**
Quaresma <i>et al.</i> 2009	Syber	0.1pg DNA / ml	Sim	Sim	β -globina canina	(35) Cães	Medula óssea e Sangue	Comparativo ²	Sangue = Medula óssea
Maia <i>et al.</i> 2010	TaqMan	1 parasito / reação	Sim	Não	β -actina canina	(12) Cães infectados experimentalmente	Baço, <i>Buffy coat</i> , Fígado, Linfonodo, Medula óssea, Pele e Sangue	Comparativo ^{1,2}	Baço / <i>Buffy coat</i> / Fígado / Linfonodo / Medula óssea / Pele > Sangue
Galletti <i>et al.</i> 2011	TaqMan	0.03 parasito / reação	Não	Não	---	(88) Cães	Linfonodo, Medula óssea, Sangue, <i>Swab</i> conjuntival	Comparativo ¹	---
Lombardo <i>et al.</i> 2011	TaqMan	ND	Não	Não	---	(138) Cães	Linfonodo, <i>Swab</i> conjuntival, <i>Swab</i> oral e Sangue	Comparativo ¹	---
Naranjo <i>et al.</i> 2011	TaqMan	ND	Sim	Não	RNA18S Eucariótico	(22) Cães doentes	Glandula Tarsal, Glandula Lacrimal principal e Glandula da Membrana nictitante	Comparativo ¹	---

* Tipo de estudo: Comparativo¹: compara o resultado das técnicas diagnósticas; Comparativo²: compara o resultado dos tecidos; ** Sensibilidade: avaliação da detecção de *Leishmania* sp. nos diferentes tecidos; \square : Não estatisticamente significativo; ND: Não disponível

II. JUSTIFICATIVA

O diagnóstico da LVC pode ser dificultado por diversos fatores, como: o curso relativamente lento da infecção (período pré-patente significativo), baixa carga parasitária e baixa produção de anticorpos nos indivíduos que controlam a infecção e são resistentes (QUINNELL *et al.*, 2001).

A maioria dos cães expostos em áreas endêmicas, se torna infectada sem demonstrar sintomas específicos e, frequentemente, com pouca ou nenhuma evidência sorológica, dificultando seu diagnóstico pelos testes sorológicos (CAMPINO *et al.*, 2000; BANETH *et al.*, 2008). É importante ressaltar o papel dos cães assintomáticos no ciclo biológico do parasito, uma vez que estudos empregando a técnica de xenodiagnóstico demonstram que estes animais também são infectantes para o flebotomíneo, funcionando como reservatórios (DA COSTA-VAL *et al.*, 2007; MICHALSKY *et al.*, 2007).

Os testes sorológicos utilizados atualmente para identificação da infecção na população canina, podem apresentar baixa sensibilidade e especificidade especialmente em cães assintomáticos, recém infectados, ou cães que apresentam um quadro clínico inespecífico (OLIVA *et al.*, 2006; COURA-VITAL *et al.*, 2011). Adicionalmente, utilizando-se estes testes, é comum a ocorrência de reação cruzada com outros patógenos que frequentemente afetam a população canina e podem causar quadros clínicos similares à LVC, como *E. canis* (FERREIRA *et al.*, 2007). Um estudo de Silva *et al.* (2011) demonstrou que em 59% dos cães soropositivos pela ELISA e RIFI, eutanasiados em uma área do Rio de Janeiro, não foi possível detectar o DNA do parasito pela cPCR. Em áreas endêmicas, é comum também a presença de cães com baixa carga parasitária, cujo diagnóstico resulta em resultados falso-negativos, principalmente quando são empregados testes parasitológicos para o diagnóstico (ALVAR *et al.*, 2004; GOMES *et al.*, 2008).

Em conjunto, as limitações dos testes sorológicos e parasitológicos, levam a falhas no diagnóstico dos cães, contribuindo para que uma parcela dos animais infectados não seja removida, ou seja removida com atraso das áreas endêmicas, favorecendo a manutenção do reservatório (BRAGA *et al.*, 1998). Esses dados apontam para a necessidade do emprego de técnicas mais sensíveis e específicas como a PCR para a confirmação da infecção por

Leishmania sp. nos cães (SOLCÀ *et al.*, 2012).

Relatos da literatura demonstram que, pelas técnicas parasitológicas e biomoleculares, os tecidos linfóides, como medula óssea e baço, são os que apresentam melhores taxas de detecção da infecção por *L. infantum* (REIS *et al.*, 2006; MAIA *et al.*, 2009; TROPIA DE ABREU *et al.*, 2011). Todavia, a obtenção destes tecidos é considerada, por alguns autores como uma técnica invasiva para os animais (CARVALHO *et al.*, 2009). Assim, para o diagnóstico da LVC, deve-se preferir utilizar outros tipos de tecidos, obtidos por procedimentos menos invasivos, como: sangue e linfonodo poplíteo.

A hipótese do presente estudo é que, empregando-se a técnica de PCR, o baço é o tecido com maior taxa de detecção do DNA de *Leishmania* sp. em cães naturalmente infectados. Desta forma, este trabalho visa comparar a performance da PCR em detectar o DNA do parasito em diferentes tecidos para diagnóstico da LVC. Com esta finalidade, inicialmente foi padronizada uma técnica de cPCR para detecção de DNA de *Leishmania* sp. empregando-se material esplênico canino. Os achados diagnósticos dessa técnica foram comparados com os resultados de sorologia (ELISA), cultivo esplênico (padrão ouro) e qPCR. Em seguida, a segunda etapa do estudo teve como finalidade determinar qual o melhor tecido a ser empregado para o diagnóstico da LVC. Assim, utilizando qPCR para detecção de DNA de *Leishmania* sp., foram comparadas as taxas de detecção de DNA do parasito de baço, medula óssea, sangue e linfonodo poplíteo, em animais com diferentes quadros clínicos.

III. OBJETIVOS

III.1. Objetivo geral

- Determinar qual o tecido mais adequado para o diagnóstico biomolecular da LVC em cães com diferentes quadros clínicos

III.2. Objetivos específicos

- Padronizar uma técnica de cPCR para amostra esplênica canina determinando sua especificidade e limite de detecção
- Comparar a sensibilidade do diagnóstico sorológico, parasitológico e biomolecular em cães com diferentes quadros clínicos
- Comparar a carga parasitária de aspirado esplênico, medula óssea, linfonodo e sangue total

IV. ARTIGO CIENTÍFICO

- **Artigo científico publicado**

SOLCÀ, M. da S.; GUEDES, C. E. S.; NASCIMENTO, E. G.; OLIVEIRA, G. G. De S.; DOS-SANTOS, W. L.; FRAGA, D. B. M.; VERAS, P. S. T. Qualitative and quantitative polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Leishmania* in spleen samples from naturally infected dogs. Vet Par, 184, pp.133–140, 2012.

Doi: 0.1016/j.vetpar.2011.08.026

O presente artigo contempla a primeira parte do estudo, que compreende a padronização de uma técnica de cPCR para amostra esplênica canina, determinando sua especificidade e limite de detecção assim como a comparação da sensibilidade do diagnóstico sorológico, parasitológico e biomolecular em cães com diferentes quadros clínicos de leishmaniose visceral.



Qualitative and quantitative polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Leishmania* in spleen samples from naturally infected dogs[☆]

Manuela da Silva Solcà^a, Carlos Eduardo Sampaio Guedes^a, Eliane Gomes Nascimento^b, Geraldo Gileno de Sá Oliveira^a, Washington Luis Conrado dos Santos^a, Deborah Bittencourt Mothé Fraga^{a,c}, Patrícia Sampaio Tavares Veras^{a,*}

^a Laboratório de Patologia e Biointervenção, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – FIOCRUZ – Rua Waldemar Falcão 121, Candeal, 40296-710 Salvador, BA, Brazil

^b Centro de Referência em Doenças Endêmicas Pirajá da Silva-PIEJ, CSU, URBIS 1, Rua 3s/n, Jequié 45200-000, BA, Brazil

^c Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, Av. Ademar de Barros 500, Salvador 40170-000, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 June 2011

Received in revised form 11 August 2011

Accepted 16 August 2011

Keywords:

Leishmania

Canine

PCR

Spleen

Diagnostic method

ABSTRACT

Because infected dogs are widely considered to be the main domestic reservoir for *Leishmania infantum* (syn *Leishmania chagasi*) parasites in Brazil, the diagnosis of canine visceral leishmaniasis (CVL) must be made both accurately and promptly. The present study attempted to standardize a conventional polymerase chain reaction (cPCR) protocol for the detection of *L. infantum* DNA in canine spleen samples. Quantitative PCR (qPCR) technique was used to confirm the presence of *Leishmania* DNA in the canine spleen fragments. A comparison was made between the efficacies of these molecular diagnostic techniques and conventional parasitological and serological methods. cPCR protocols for spleen samples were standardized using primers that amplify a 145 bp fragment, located at the parasite kinetoplast minicircle. The genus specificity of the cPCR protocol was assessed by its inability to amplify the DNA of other common canine pathogens, such as *Ehrlichia canis*, *Babesia canis*, *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi*. cPCR protocol sensitivity was tested by assessing the reaction detection limit, determined to be 10 fg of *L. infantum* reference strain DNA, which corresponds to a range of 0.03–0.1 parasites per fragment. Standardized cPCR protocol was used to detect the presence of *Leishmania* in 45 dog spleen samples. Our results showed that 40% of the spleen fragment cultures were positive for *Leishmania* parasites, 58% of the dog serum samples tested positive using ELISA, and parasite DNA was detected in 44% using qPCR, while 47% of the spleen samples using cPCR. Diagnostic methods performance was assessed and revealed a better degree of ascertainment for cPCR when compared to other diagnostic methods. The sensitivity of ELISA was 83.3%, qPCR was 83.3%, and cPCR was 88.9%; PPV for ELISA was 57.7%, qPCR was 75% and cPCR was 76.2%; the Kappa coefficients were found to be 0.40 (fair) for ELISA, 0.64 (substantial) for qPCR and 0.68 (substantial) for cPCR. In both oligosymptomatic and polysymptomatic dogs, cPCR revealed the better performance analysis when compared to other diagnostic methods. The findings presented herein establish cPCR as the most indicated test to detect *Leishmania* when compared to the other two diagnostic methods

[☆] Support for this research was provided by FAPESB, INCT-CNPq, PDTIS.

* Corresponding author. Tel.: +55 71 3176 2263; fax: +55 71 3176 2290.

E-mail addresses: pveras@bahia.fiocruz.br, pstveras@gmail.com (P.S.T. Veras).

evaluated. Despite the fact that the qPCR protocol provides a highly accurate quantification of parasites when targeting the SSU rRNA gene, this technique does not significantly improve the diagnosis of CVL when compared with the performance of the cPCR protocol, which focused on the kinetoplast minicircle.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Zoonotic visceral leishmaniasis is a disease caused by *Leishmania infantum* (syn *Leishmania chagasi*) (Kuhls et al., 2011) a protozoan parasite that affects both dogs and humans (Lainson and Shaw, 1978). *Leishmania* is transmitted to human and animal hosts via Phlebotominae sand flies (Killick-Kendrick, 1999) and, due to a high degree of skin parasitism, domestic dogs are considered to be the main reservoir of this parasite (Deane and Deane, 1955; Dye, 1996; Gramiccia and Gradoni, 2005). Canine visceral leishmaniasis (CVL) can present as an asymptomatic infection or one with non-specific clinical signs, such as weight loss, alopecia, cutaneous lesions, conjunctivitis, onychogryphosis and lymphadenopathy (Ciaramella et al., 1997; Koutinas et al., 1999; Baneth et al., 2008).

Considering the growing prevalence of CVL, the development and implementation of more sensitive and specific diagnostic techniques is crucial to controlling this disease (Alvar et al., 2004). CVL diagnosis may prove challenging due to a variety of factors, such as a long course of infection (significant pre-patent period), a low parasite load in certain tissues and varied immune responses among resistant and susceptible dogs (Pinelli et al., 1999; Quinnell et al., 2001). The current gold standard diagnosis for visceral leishmaniasis (VL) is parasite identification in the tissue of host species (Barrouin-Melo et al., 2004). However, the low degree of sensibility of this method, serological diagnostic tests, such as the indirect immunofluorescence assay (IFA) and the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), are the methods generally used to detect VL (Alvar et al., 2004). However, the literature contains several reports of cross-reactivity when using these serological tests, specifically in sera from dogs infected with other common pathogens, such as *Toxoplasma gondii*, *Ehrlichia canis* and *Trypanosoma cruzi*, as well as other *Leishmania* species (Ferreira et al., 2007; Troncarelli et al., 2009). Furthermore, the failure of conventional methods to accurately diagnose asymptomatic dogs, when compared with biomolecular diagnostic techniques, has been reported (Solano-Gallego et al., 2001).

Conventional polymerase chain reaction (cPCR) analysis is a simple molecular technique for disease diagnosis, which has shown improved specificity and sensitivity over serological CVL diagnostic methods (Ashford et al., 1995; Moreira et al., 2007; Maia et al., 2009), since it allows for the detection of asymptomatic carriers (Berrahal et al., 1996; Lachaud et al., 2002).

A positive correlation exists between parasite load and disease manifestation in dogs with severe clinical signs (Manna et al., 2009), emphasizing the need for highly sensitive diagnostic techniques to detect infection in animals with less parasitization.

Reis et al. (2006) demonstrated that the spleen is one of the main sites where high parasite density is found during the course of CVL in both asymptomatic and symptomatic dogs. In addition, the spleen has been proposed as a key site for the accumulation and multiplication of *Leishmania* (Maia et al., 2009). These parasites are known to survive for extended periods in the spleen, as has been previously described in an experimental murine model employing infection with viscerotropic *Leishmania* (Lima et al., 2007). Previous studies have demonstrated that, as early as 96 h after experimental intradermal infection with *L. donovani* promastigotes, parasites were detected in canine draining lymph nodes and spleen (Saldarriaga et al., 2006). Moreover, another study found variable degrees of splenomegaly in the majority of CVL-infected dogs studied (Barrouin-Melo et al., 2006).

A previous study showed that splenic fine needle aspiration had a higher rate of parasite detection, in comparison with lymph node aspiration, using conventional parasitological techniques (Barrouin-Melo et al., 2004). Another study revealed that splenic aspiration appeared to be a more sensitive procedure than bone marrow aspiration, as well as being less painful and more tolerable in human patients (Sarker et al., 2004).

The present study aimed to standardize a cPCR protocol previously described by Lachaud et al. (2002) in order to detect parasite DNA in spleen fragments. The efficacy of conventional parasitological and serological diagnostic methods was compared to alternative molecular diagnostic techniques by testing the degree of specificity and sensitivity for CVL.

2. Materials and methods

2.1. Sampling

Forty-five canine spleen fragments from an endemic area for CVL were collected in 2006 during a compulsory euthanasia program involving stray dogs in the City of Jequié, located in the State of Bahia, Brazil. Each fragment was collected during necropsy using a sterile blade, and then was stored in liquid nitrogen until use. Prior to spleen fragment collection, the stray dogs were submitted to clinical, serological (ELISA) and parasitological (spleen culture) evaluation for CVL. The ELISA technique and canine spleen fragment culture test, the gold standard, were performed as described in previous studies (Paranhos-Silva et al., 1996; Baleeiro et al., 2006). The spleen fragments were cultured for a period of 4 weeks in Novy–MacNeal–Nicolle (NNN) biphasic medium at 23 °C, supplemented with 20% FBS (Fetal Bovine Serum – Gibco BRL, New York, USA) and 100 µg/mL gentamicin to avoid contamination (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (Barrouin-Melo et al., 2004). For parasite identification, microscopic observations

were performed at weekly intervals for no less than 4 weeks. Dogs were clinically classified according to the presence or absence of common clinical signs of CVL, including weight loss, alopecia, cutaneous lesions, conjunctivitis, onychogryphosis and lymphadenopathy. According to Mancianti et al. (1988) in the absence of any observable signs, dogs were considered to be asymptomatic; in the presence of one to three clinical signs, dogs were classified as oligosymptomatic, in the presence of three or more signs, dogs were determined to be polysymptomatic.

2.2. DNA extraction

Frozen canine spleen fragments from euthanized dogs were thawed and DNA was extracted from a 20 mg section using a DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) in accordance with manufacturer protocols. Once extracted, the quality and concentration of each DNA sample was determined using a digital spectrophotometer (NanoDrop® ND-1000, Thermo Scientific, Wilmington, USA). The integrity of each DNA sample was evaluated using a 0.8% agarose gel. The DNA samples were then adjusted to concentration of 150 ng/μl, aliquoted and stored at –20 °C until cPCR and quantitative PCR (qPCR) assays were performed.

2.3. cPCR

To detect parasite DNA in canine spleen samples, cPCR assays were performed using the technique for parasite DNA detection in canine blood samples described by Lachaud et al. (2002). Under standardized conditions, amplification was performed in a 20 μl final volume containing: 150 ng of DNA; dATP, dCTP, dGTP and dTTP at 10 μM each (dNTP Mix® Promega, Madison, USA); 1.5 mM MgCl₂; 2 μl PCR buffer at a concentration of 10×; 1.25 U of Taq DNA Polymerase (GoTaq® DNA Polymerase®, Promega); 1 μM of each of the following primers: 5'-CTTTCTGGTCCCGGGTAGG-3' (RV1) and 5'-CCACCTGGCCTATTTACACCA-3' (RV2). All amplifications were performed using a thermal cycler (Mastercycler® Family, Eppendorf, Hamburg, Germany) as follows: 35 cycles at 94 °C for 30 s; annealing at 62 °C for 30 s; and an extension step at 72 °C for 90 s. For negative controls, deionized water was used, as well as canine spleen fragment DNA (150 ng/μl) from each of the uninfected dogs. *L. infantum* (MHOM/BR/2000/MER2) DNA (10 ng/μl) was used as a positive control in each reaction.

The reaction products were separated by electrophoresis in a 2% agarose gel for 1 h 40 min at 140 V, 240 mA in a 0.5× TBE buffer [0.04 M Tris–borate–HCl (JTBaker, MEX, MEX) with 10 mM EDTA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)]. Gels were stained in a solution containing 0.5 μg/mL ethidium bromide (Sigma, St. Louis, MO, USA) and distilled water. Gel images were captured under UV light (Gel Doc, Bio-Rad, CA, USA) (Schriefer et al., 2004).

2.4. cPCR standardization

Assay standardization was performed in order to adapt the previously described PCR technique (Lachaud

et al., 2002) used to analyze DNA taken from human blood samples to our technique, which obtained DNA from canine spleen fragments. cPCR specificity was assessed by performing amplification reactions using DNA samples from pathogens other than *L. infantum*; *Leishmania major* (MHOM/IR/-/173), *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/88/BA125), *E. canis*, *B. canis*, *T. gondii*, and *T. cruzi*.

Fifteen healthy dogs were raised at the CPqGM-FIOCRUZ experimental kennel in Salvador, Brazil, a location known to be negative for parasite transmission. Sera from all 15 dogs tested negative using ELISA (Paranhos-Silva et al., 1996) and their spleen cultures were also found to be negative for parasite growth. Splenic aspirate DNA samples from 15 healthy dogs were used to test whether cPCR reactions amplified targets other than parasite DNA. Protocol sensitivity was assessed by performing: (a) serial dilutions of DNA samples from positive controls, ranging from 10 to 200 ng; (b) contamination of splenic aspirate DNA (150 ng) from 1 of the 15 healthy dogs with a serial dilution of parasite DNA, ranging from 10 ng to 1 fg. Each PCR reaction was run using several controls: (a) for positive controls, (1) DNA samples (150 ng/μl) from three dogs whose spleen fragment cultures tested positive for *Leishmania* sp., and (2) purified DNA from *L. infantum* (10 ng/μl) reference strain; (b) for negative controls, (1) splenic aspirate DNA (100 ng/μl) from 1 of the 15 healthy dogs, and (2) deionized water instead of DNA samples.

2.5. Quantitative PCR (qPCR)

To quantify parasite DNA in canine spleen fragments, PCR assays were performed using a technique for parasite DNA quantification in human blood samples as described by Bossolasco et al. (2003) targeting a SSU rRNA gene sequence. The amplifications were performed at a final volume of 25 μl, containing: 5 μl of 150 ng/μl of DNA spleen fragment diluted in deionized water and 20 μl of PCR mixture, which consisted of 12.5 μl of Universal Mastermix (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) and forward primer 5'-AAGGTCAAAGAACAAGGCCAAG-3' (LEIF-forward) at a final concentration of 900 nM, reverse primer 5'-GCATCGGAGTCGG-3' (LEIR-reverse) at 300 nM, and a fluorogenic probe (5'-AGGAGCGTGTCCCGTGGAGG-3'), which was synthesized using a FAM reporter molecule attached to the 5' end, as well as a TAMRA quencher linked to the 3' end (LEIP-probe) (Perkin-Elmer Applied Biosystems), at a final concentration of 200 nM. A standard curve was generated using tenfold serial dilutions of *L. infantum* DNA, ranging from 10⁶ to 10⁻¹ parasites/mL, with each dilution performed in triplicate. Amplification was performed in quintuplicate for each sample, as well as a negative control, using an ABI Prism 5900 sequence detection system (Perkin-Elmer Applied Biosystems). The cycling parameters were 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min, and 50 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. A threshold cycle value (Ct) was calculated for each sample by determining the point at which the fluorescence generated within a given reaction exceeded the threshold limit. The standard curve was drawn by plotting Ct values against the standardized parasite concentrations. The number of

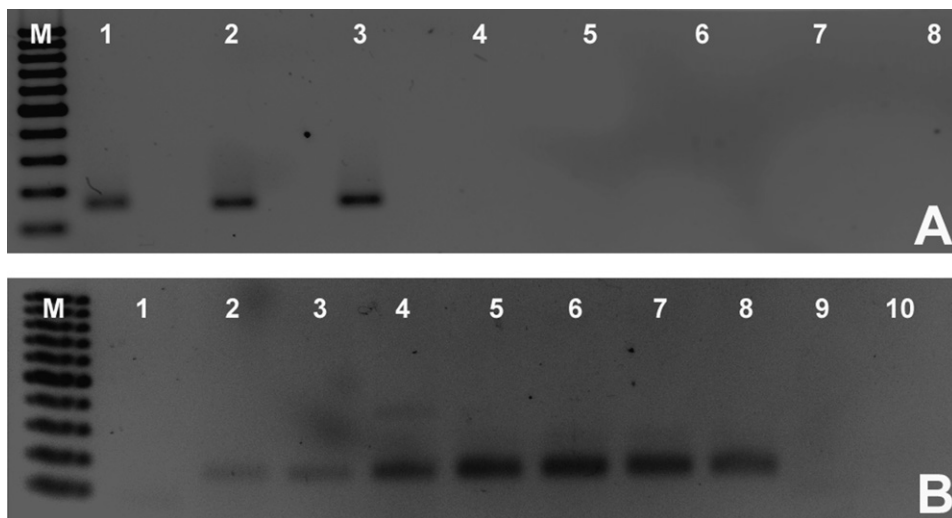


Fig. 1. Evaluation of cPCR protocol specificity and sensitivity. PCR products were size-separated by agarose gel electrophoresis and visualized using ethidium bromide staining. Each PCR reaction was run under standardized conditions as described in material and methods. Amplified PCR products using RV1 and RV2 primers correspond to the 145 base-pair band. (A) Agarose gel showing cPCR specificity. PCR products can be seen in lanes 1–3, corresponding to *L. infantum*, *L. amazonensis* and *L. major* reference strain DNA, respectively; lanes 4–7 correspond to DNA isolate from *T. cruzi*, *E. canis*, *B. canis* and *T. gondii*. Lane 8 corresponds to negative control (water); M = 100 bp DNA ladder marker. (B) Agarose gel showing cPCR sensitivity. PCR amplification was performed using healthy canine spleen DNA and varying concentrations of *L. infantum* reference strain DNA. Lanes 1–8 correspond to 1 fg, 10 fg, 100 fg, 1 pg, 10 pg, 100 pg, 1 ng, and 10 ng, respectively. Lane 9 corresponds to healthy dog DNA; lane 10 corresponds to negative control (water); M = 100 bp DNA ladder marker.

parasites per sample was calculated as the mean of the values obtained in at least three out of the five sample aliquots. The method detection limit of the qPCR technique was estimated to be 0.5 parasites/mL.

2.6. Decontamination procedures

Due to the extremely high degree of sensitivity inherent in cPCR and qPCR techniques, special care was taken to avoid any contamination of the DNA samples during all procedures. To prevent carryover contamination by previously amplified DNA, filter tips were routinely used in all DNA extraction steps, as well as during cPCR and qPCR. In addition, the laminar flow hood and all utilized materials were decontaminated by UV radiation before and after each procedure. For each cPCR and qPCR amplification procedure, the PCR mixture was first placed in each well, followed by a dilution containing either spleen sample DNA, or *L. infantum* DNA. The cPCR protocol utilized a randomization of DNA samples and negative controls in order to confirm the absence of contamination.

2.7. Statistical analysis

Databases were built using Excel (Microsoft Office), and Epi-info™ 3.5.1 (Centers for Disease Control and Prevention – CDC, USA) was used to analyze and correlate clinical, serological, parasitological and bio-molecular parameters. The sensitivity and specificity of the cPCR protocol were assessed using canine spleen cultures as the “gold standard” for *L. infantum* parasite detection (Barrouin-Melo et al., 2004). Sensitivity and specificity percentages were calculated using a 2 × 2 contingency table which represents the distribution of positive and negative test results.

Differences between the sensitivity and specificity of each diagnostic test were assessed using the χ^2 -test (p -value <0.05). The Kappa coefficient was calculated for each of the diagnostic methods with a 95% confidence interval (CI). This coefficient was used to test agreement between the diagnostic methods and was interpreted according to Landis and Koch (1977): 1.00–0.81 almost perfect, 0.80–0.61 substantial, 0.60–0.41 moderate, 0.40–0.21 fair and ≤ 0.20 slight. Additionally, positive predictive values (PPV) and negative predictive values (NPV) were measured for each of the diagnostic methods (p -value ≤ 0.05).

3. Results

3.1. cPCR protocol standardization

The specificity of the established cPCR protocol was assessed using RV1 and RV2 primers to amplify DNA from *T. cruzi*, *E. canis*, *B. canis* and *T. gondii*, which did not amplify any fragments (Lanes 4–7 in Fig. 1A), while these same primers successfully amplified a 145 bp fragment of *Leishmania* spp. DNA (Lanes 1–3, Fig. 1A). No amplification was observed in lane 8, which refers to the negative control.

The cPCR detection limit was 10 fg of *L. infantum* DNA on agarose gel in lanes 1–8 correspond to 1 fg, 10 fg, 100 fg, 1 pg, 10 pg, 100 pg, 1 ng, and 10 ng, respectively (Fig. 1B). No amplification occurred in lane 1, which corresponds to 1 fg of *L. infantum* reference strain DNA, nor in lane 9, which refers to a healthy dog DNA sample. No amplification was observed in lane 10, which corresponds to water as a negative control (Fig. 1B). As DNA spleen samples at a concentration of 150 ng yielded the clearest band patterns, this DNA concentration was used for the cPCR assay (data not shown). When 150 ng of healthy canine spleen

Table 1
Comparison of diagnostic methods and clinical evaluation.

Clinical evaluation	Diagnostic test positivity rate n ^a (%)				
	Culture	ELISA	cPCR	qPCR	Negative ^b
Asymptomatic	1/8 (12.5)	2/8 (25.0)	2/8 (25.0)	1/8 (12.5)	4/8 (50.0)
Oligosymptomatic	9/26 (34.6)	14/26 (46.2)	10/26 (38.5)	11/26 (42.3)	7/26 (27.0)
Polysymptomatic	8/11 (72.7)	10/11 (90.9)	9/11 (81.8)	8/11 (72.7)	1/11 (9.0)

^a Number of positive dogs.^b Dogs tested negative for all diagnostic tests.

DNA was added to the PCR mixture, the detection limit of *L. infantum* reference strain DNA was similar to that of parasite DNA alone (10 fg, data not shown). No amplification was observed in any of the cPCR reactions using the 15 DNA spleen samples from the uninfected dogs (data not shown).

3.2. Comparison of diagnostic methods and clinical evaluation

Leishmania parasites were found in 40% (18/45) of the canine spleen cultures. Anti-*Leishmania* antibodies were found in 58% (26/45) of canine serum samples using ELISA. Parasite DNA was detected in 44% (20/45) of the spleen fragments using qPCR, and in 47% (21/45) using cPCR. Thirty-two out of a total of 45 dogs tested positive for CVL (71%) using at least one of these four diagnostic methods. Twelve dogs had positive test results from only one of the diagnostic tests: parasites were identified in the spleen cultures of two dogs (4%), eight dogs (18%) tested positive using ELISA, a spleen fragment from one dog tested positive using qPCR (2%), and another was positive using cPCR (2%).

Clinical evaluation for signs of CVL found 18% (8/45) of the dogs to be classified as asymptomatic, 58% (26/45) as oligosymptomatic, and 24% (11/45) as polysymptomatic. Considering the eight asymptomatic dogs, four tested positive for CVL (50%), only one dog (12.5%) was positive using all four diagnostic methods, the others three were detected each one by a different diagnostic method (Table 1). Among the 26 oligosymptomatic dogs, nineteen (73%) tested positive for CVL, five dogs (26%) were positive using all four diagnostic tests, the others tested positive at least in one test (Table 1). Among the 11 polysymptomatic dogs, ten dogs (91%) tested positive, seven of them (70%) were positive using all four diagnostic tests, the others tested positive at least in one test (Table 1).

3.3. Evaluation of diagnostic methods' performance

Sensitivity, PPV and NPV for each test were estimated using parasite culture as the gold standard. ELISA sensitivity was 83.3% (CI 57.7–95.6), qPCR was 83.3% (CI 57.7–95.6) and cPCR was 88.9% (CI 63.9–98.1). PPV for ELISA was 57.7% (CI 37.2–76.0), qPCR was 75% (CI 50.6–90.4) and cPCR was 76.2% (CI 52.4–90.9). NPV for ELISA was 84.2% (CI 59.5–95.8), qPCR was 88% (CI 66.7–96.8) and cPCR was 91.7% (CI 71.5–98.5). The Kappa coefficient was calculated to measure the agreement index between the gold standard and each of the three diagnostic tests used. The Kappa

Table 2
Diagnostic method performance analysis.

Diagnostic method	Sensitivity (%)	PPV (%)	NPV (%)	Kappa
ELISA	83.3	57.7	84.2	0.40
qPCR	83.3	75.0	88.0	0.64
cPCR	88.9	76.2	91.7	0.68

Canine spleen cultures were used as the "gold standard". χ^2 -test (p -value < 0.05).

coefficients were found to be 0.40 (fair) for ELISA, 0.64 (substantial) for qPCR and 0.68 (substantial) for cPCR (Table 2).

To evaluate diagnostic test performance with respect to clinical CVL evaluation, Kappa coefficients and PPVs were used to compare each diagnostic method to the gold standard (Table 3). The number of asymptomatic dogs was insufficient to perform statistical analyses ($n=4$). In the oligosymptomatic group (dogs presenting at least three signs of CVL), PPV for ELISA was 43% and Kappa was 0.17 (slight), PPV for qPCR was 64% and Kappa was 0.52 (moderate), and PPV for cPCR was 70% and Kappa was 0.59 (moderate). In the polysymptomatic group (dogs presenting with more than three clinical signs of CVL) PPV for ELISA was 80% and Kappa was 0.42 (moderate), PPV for qPCR was 87.5% and Kappa was 0.54 (moderate), PPV for cPCR was 89% and Kappa was 0.74 (substantial).

4. Discussion

The present study endeavored to standardize a cPCR protocol for the detection of *L. infantum* DNA in canine spleen samples, based on the protocol described by Lachaud et al. (2002), previously used to detect *L. infantum* kDNA in human blood samples. The specificity of this cPCR protocol was tested by its inability to amplify DNA from pathogens other than trypanosomatids, such as *B. canis*, *E. canis* and *T. gondii* (Fig. 1A). These microorganisms are known to frequently infect dogs in Brazil and

Table 3
Diagnostic method performance analysis with respect to clinical CVL evaluation.

Diagnostic method	Oligosymptomatic (n = 26)		Polysymptomatic (n = 11)	
	PPV	Kappa	PPV	Kappa
ELISA	43.0%	0.17	80.0%	0.42
qPCR	64.0%	0.52	87.5%	0.54
cPCR	70.0%	0.59	89.0%	0.74

Canine spleen cultures were used as the "gold standard". χ^2 -test (p -value < 0.05).

may be responsible for serological cross-reactions in commonly used *Leishmania* tests, leading to false positives (Alves and Bevilacqua, 2004; Marcondes et al., 2011). Most commercially available immunological tests are not able to distinguish between different trypanosomatids, for example *T. cruzi*, from *Leishmania* (Troncarelli et al., 2009). In order to further test the cPCR protocol's specificity, *T. cruzi* DNA was subjected to the amplification protocol. The RV1 and RV2 primers were unsuccessful in amplifying *T. cruzi* DNA, demonstrating that these primers do not anneal with DNA from trypanosomatids other than *Leishmania*. By contrast, our cPCR protocol successfully amplified DNA from *L. amazonensis* and *L. major* reference strains (Fig. 1A).

In apparent contradiction to the results presented herein, Lima-Junior et al. (2009) detected no amplification of *L. amazonensis* and *L. braziliensis* DNA using RV1 and RV2 primers. These divergent results might be explained by differences in the assay protocols or strains used. Furthermore, the primers employed in the present study were designed to interact with a target region in the parasite kinetoplast minicircle, a highly conserved DNA region throughout the genus *Leishmania* (Sheline and Ray, 1989). The findings herein support the notion that RV1 and RV2 are not species-specific. New protocols capable of distinguishing between *Leishmania* species need to be developed, since some areas are endemic for both cutaneous and visceral forms of the disease (Coutinho et al., 1985; Madeira et al., 2006).

cPCR protocol sensitivity was tested by assessing the reaction detection limit, determined to be 10 fg of *L. infantum* reference strain DNA. Similar results were obtained when reference strain DNA was mixed with spleen fragment DNA from a healthy dog (Fig. 1B). This limit of DNA concentration corresponds to a range of 0.03–0.1 parasites per fragment (Vitale et al., 2004; Quaresma et al., 2009), ensuring successful DNA detection in samples with low parasite burden, such as those found in asymptomatic or in the recently classified category of exposed animals (Leontides et al., 2002; Manna et al., 2009; Paltrinieri et al., 2010). To further assess protocol sensitivity, cPCR reactions were performed using varying amounts of splenic DNA from infected dogs. Again, no amplification was observed in reactions with less than 10 fg of DNA. The amplification products obtained using 150 and 200 ng of splenic DNA from infected dogs yielded the clearest band patterns, while those from a 100 ng concentration were less clear (data not shown). DNA concentrations greater than 150 ng were discarded in order to avoid cPCR reaction inhibitors.

The ELISA diagnostic test method had the highest positivity rate of the four tests, with 58% of all dogs testing positive, while the spleen culture test had the lowest rate of positivity, 40%. It is possible that the elevated positivity rate associated with ELISA is due to the fact that stray dogs were employed in the present study, which may have been infected with pathogens other than *Leishmania*, leading to cross-reaction results (Lira et al., 2006). Our laboratory is currently conducting experiments using cPCR protocols to detect hemoparasitosis infection in dogs suspected for CVL. The notion that serum cross-reactivity is occurring in our

analysis is supported by the finding of a low PPV (57.7%) for ELISA (Table 2).

Performance analysis of cPCR found that this protocol had the highest Kappa coefficient (0.68), highest PPV (76.2%) and highest rate of sensitivity (88.9%) in comparison to the other diagnostic tests (Table 2). The literature contains several reports of higher qPCR sensitivity in relation to cPCR or ELISA (Francino et al., 2006; Quaresma et al., 2009). However, depending on the selected DNA target region, as well as the pair of primers used (Bastien et al., 2008), qPCR is not always more sensitive than cPCR. Several protocols targeting genomic or kinetoplast DNA (kDNA) have been developed for CVL (Solano-Gallego et al., 2009). Due to a high number of target copies, conventional assays based on kDNA are considered to be the most sensitive for CVL detection (Cortes et al., 2004; Gomes et al., 2008). When qPCR protocols target a less repetitive sequence, such as SSU rRNA, they exhibit a lower degree of sensitivity than cPCR protocols which employ the kinetoplast minicircle as a target.

As expected, the positivity rate of all four diagnostic tests used in this study increased in accordance with the severity of clinical manifestation (Table 1). Data in the present study show a low rate of diagnostic test sensitivity among the asymptomatic dogs, which underscores the need to use more than one test to confirm *Leishmania* detection. However, a single diagnostic test was shown to adequately confirm parasite infection among the oligosymptomatic and polysymptomatic dogs. In both of these groups, the performance analysis of cPCR revealed a better degree of ascertainment when compared to other diagnostic methods (Table 3).

One of the major concerns surrounding the use of spleen aspiration is the risk of severe bleeding and even death (Léveillé et al., 1993), which can be controlled using abdominal ultrasonography (Watson et al., 2010), thereby minimizing risk to the animal. In fact, Barrouin-Melo et al. (2006), in an attempt to verify the safety of fine-needle spleen aspiration, reported no adverse incidents when conducting this procedure in over 200 dogs. Spleen aspirate appeared to be better tolerated than lymph node aspiration, even in the most severely affected dogs, which exhibited severe anemia and cachexia (Barrouin-Melo et al., 2004).

One of the limitations regarding the use of molecular analysis to diagnose *Leishmania* is the fact that, compared to conventional serological tests, these techniques are considerably more expensive (Maia et al., 2009). However, the authors chose to employ molecular diagnosis for *Leishmania* as a confirmative test due to the greater sensitivity and specificity of cPCR and qPCR compared to serological testing.

The findings presented herein establish cPCR as the most indicated test to detect *Leishmania* when compared to the other two diagnostic methods evaluated. Despite the fact that the qPCR protocol provides a highly accurate quantification of parasites when targeting the SSU rRNA gene, this technique does not significantly improve the diagnosis of CVL when compared with the performance of the cPCR protocol that targets the kinetoplast minicircle and has the additional advantage to be cheaper than qPCR.

5. Conclusion

The standardized cPCR protocol using canine spleen fragment samples was shown to be a sensitive and efficient tool for the diagnosis of *Leishmania* infection.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest exist in the present study.

Ethics committee approval

The present study was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of CPqGM-FIOCRUZ, protocol CEUA 040/2005.

Acknowledgements

The authors would like to thank Andris K. Walter for providing English revision and consulting services. This work was supported by grants and fellowships from FAPESB (Fundação de Amparo a Pesquisa no Estado da Bahia) and CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento). Veras, PST holds a grant from CNPq for productivity in research (306672/2008-1).

References

- Alvar, J., Canavate, C., Molina, R., Moreno, J., Nieto, J., 2004. Canine leishmaniasis. *Adv. Parasitol.* 57, 1–88.
- Alves, W.A., Bevilacqua, P.D., 2004. Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993–1997. *Cad. Saude Publica* 20, 259–265.
- Ashford, D.A., Bozza, M., Freire, M., Miranda, J.C., Sherlock, I., Eulalio, C., Lopes, U., Fernandes, O., Degraive, W., Barker Jr., R.H., et al., 1995. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53, 251–255.
- Baleeiro, C.O., Paranhos-Silva, M., dos Santos, J.C., Oliveira, G.G., Nascimento, E.G., de Carvalho, L.P., dos-Santos, W.L., 2006. Montenegro's skin reactions and antibodies against different *Leishmania* species in dogs from a visceral leishmaniasis endemic area. *Vet. Parasitol.* 139, 21–28.
- Baneth, G., Koutinas, A.F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., Ferrer, L., 2008. Canine leishmaniasis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol.* 24, 324–330.
- Barrouin-Melo, S.M., Larangeira, D.F., Trigo, J., Aguiar, P.H., dos-Santos, W.L., Pontes-de-Carvalho, L., 2004. Comparison between splenic and lymph node aspirations as sampling methods for the parasitological detection of *Leishmania chagasi* infection in dogs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99, 195–197.
- Barrouin-Melo, S.M., Larangeira, D.F., de Andrade Filho, F.A., Trigo, J., Juliao, F.S., Franke, C.R., Palis Aguiar, P.H., Conrado dos-Santos, W.L., Pontes-de-Carvalho, L., 2006. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. *Vet. J.* 171, 331–339.
- Bastien, P., Procop, G.W., Reischl, U., 2008. Quantitative real-time PCR is not more sensitive than “conventional” PCR. *J. Clin. Microbiol.* 46, 1897–1900.
- Berrahal, F., Mary, C., Roze, M., Berenger, A., Escoffier, K., Lamouroux, D., Dunan, S., 1996. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55, 273–277.
- Bossolasco, S., Gaiera, G., Olchini, D., Gulletta, M., Martello, L., Bestetti, A., Bossi, L., Germagnoli, L., Lazzarin, A., Uberti-Foppa, C., Cinque, P., 2003. Real-time PCR assay for clinical management of human immunodeficiency virus-infected patients with visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 41, 5080–5084.
- Ciaramella, P., Oliva, G., Luna, R.D., Gradoni, L., Ambrosio, R., Cortese, L., Scalone, A., Persechino, A., 1997. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet. Rec.* 141, 539–543.
- Cortes, S., Rolao, N., Ramada, J., Campino, L., 2004. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 98, 12–17.
- Coutinho, S.G., Nunes, M.P., Marzochi, M.C., Tramontano, N., 1985. A survey for American cutaneous and visceral leishmaniasis among 1,342 dogs from areas in Rio de Janeiro (Brazil) where the human diseases occur. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 80, 17–22.
- Deane, L.M., Deane, M.P., 1955. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani*, em área endêmica de calazar no Ceará. *O Hospital* 48, 61–76.
- Dye, C., 1996. The logic of visceral leishmaniasis control. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55, 125–130.
- Ferreira, E.d.C., de Lana, M., Carneiro, M., Reis, A.B., Paes, D.V., da Silva, E.S., Schallig, H., Gontijo, C.M., 2007. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet. Parasitol.* 146, 235–241.
- Francino, O., Altet, L., Sanchez-Robert, E., Rodriguez, A., Solano-Gallego, L., Alberola, J., Ferrer, L., Sanchez, A., Roura, X., 2006. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 137, 214–221.
- Gomes, Y.M., Paiva Cavalcanti, M., Lira, R.A., Abath, F.G., Alves, L.C., 2008. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *Vet. J.* 175, 45–52.
- Gramiccia, M., Gradoni, L., 2005. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int. J. Parasitol.* 35, 1169–1180.
- Killick-Kendrick, R., 1999. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin. Dermatol.* 17, 279–289.
- Koutinas, A.F., Polizopoulou, Z.S., Saridomichelakis, M.N., Argyriadis, D., Fytianou, A., Plevraki, K.G., 1999. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989–1996). *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 35, 376–383.
- Kuhls, K., Alam, M.Z., Cupolillo, E., Ferreira, G.E.M., Mauricio, I.L., Odd-one, R., Feliciangeli, M.D., Wirth, T., Miles, M.A., Schönian, G., 2011. Comparative Microsatellite Typing of New World *Leishmania infantum* Reveals Low Heterogeneity among Populations and Its Recent Old World Origin. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1155.
- Lachaud, L., Chabbert, E., Dubessay, P., Dereure, J., Lamothe, J., Dedet, J.P., Bastien, P., 2002. Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. *Parasitology* 125, 197–207.
- Lainson, R., Shaw, J.J., 1978. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. *Nature* 273, 595–600.
- Landis, J.R., Koch, G.G., 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33, 159–174.
- Leontides, L.S., Saridomichelakis, M.N., Billinis, C., Kontos, V., Koutinas, A.F., Galatos, A.D., Mylonakis, M.E., 2002. A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. *Vet. Parasitol.* 109, 19–27.
- Léveillé, R., Partington, B.P., Biller, D.S., Miyabayashi, T., 1993. Complications after ultrasound-guided biopsy of abdominal structures in dogs and cats: 246 cases (1984–1991). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 203, 413–415.
- Lima, W.G., Oliveira, P.S., Caliari, M.V., Goncalves, R., Michalick, M.S., Melo, M.N., Tafuri, W.L., 2007. Histopathological and immunohistochemical study of type 3 complement receptors (CD11b/CD18) in livers and spleens of asymptomatic and symptomatic dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 117, 129–136.
- Lima-Junior, M.S.d.C., Andreotti, R., Dorval, M.E.M.C., Oshiro, E.T., Oliveira, A.G., Matos, M.d.F.C., 2009. Identification of *Leishmania* species isolated in human cases in Mato Grosso do Sul, by means of the polymerase chain reaction. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 42, 303–308.
- Lira, R.A., Cavalcanti, M.P., Nakazawa, M., Ferreira, A.G., Silva, E.D., Abath, F.G., Alves, L.C., Souza, W.V., Gomes, Y.M., 2006. Canine visceral leishmaniasis: a comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. *Vet. Parasitol.* 137, 11–16.
- Madeira, M.F., Schubach, A., Schubach, T.M., Pacheco, R.S., Oliveira, F.S., Pereira, S.A., Figueiredo, F.B., Baptista, C., Marzochi, M.C., 2006. Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 100, 442–445.

- Maia, C., Ramada, J., Cristovao, J.M., Goncalves, L., Campino, L., 2009. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet. J.* 179, 142–144.
- Mancianti, F., Gramiccia, M., Gradoni, L., Pieri, S., 1988. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82, 566–567.
- Manna, L., Reale, S., Vitale, F., Gravino, A.E., 2009. Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. *Res. Vet. Sci.* 87, 76–78.
- Marcondes, M., Biondo, A.W., Gomes, A.A., Silva, A.R., Vieira, R.F., Camacho, A.A., Quinn, J., Chandrashekar, R., 2011. Validation of a *Leishmania infantum* ELISA rapid test for serological diagnosis of *Leishmania chagasi* in dogs. *Vet. Parasitol.* 175, 15–19.
- Moreira, M.A., Luvizotto, M.C., Garcia, J.F., Corbett, C.E., Laurenti, M.D., 2007. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Vet. Parasitol.* 145, 245–252.
- Paltrinieri, S., Solano-Gallego, L., Fondati, A., Lubas, G., Gradoni, L., Castagnaro, M., Crotti, A., Maroli, M., Oliva, G., Roura, X., Zatelli, A., Zini, E., 2010. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1, 1184–1191.
- Paranhos-Silva, M., Freitas, L.A., Santos, W.C., Grimaldi, G.J., Pontes-de-Carvalho, L.C., Oliveira-dos-Santos, A.J., 1996. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55, 39–44.
- Pinelli, E., Rutten, V.P., Bruysters, M., Moore, P.F., Ruitenber, E.J., 1999. Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania infantum*-infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation and gamma interferon production. *Infect. Immun.* 67, 237–243.
- Quaresma, P.F., Murta, S.M., Ferreira Ede, C., da Rocha-Lima, A.C., Xavier, A.A., Gontijo, C.M., 2009. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. *Acta Trop.* 111, 289–294.
- Quinnell, R.J., Courtenay, O., Davidson, S., Garcez, L., Lambson, B., Ramos, P., Shaw, J.J., Shaw, M.A., Dye, C., 2001. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. *Parasitology* 122, 253–261.
- Reis, A.B., Martins-Filho, O.A., Teixeira-Carvalho, A., Carvalho, M.G., Mayrink, W., Franca-Silva, J.C., Giunchetti, R.C., Genaro, O., Correa-Oliveira, R., 2006. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res. Vet. Sci.* 81, 68–75.
- Saldarriaga, O.A., Travi, B.L., Park, W., Perez, L.E., Melby, P.C., 2006. Immunogenicity of a multicomponent DNA vaccine against visceral leishmaniasis in dogs. *Vaccine* 24, 1928–1940.
- Sarker, C.B., Alam, K.S., Jamal, M.F., Rahman, S., Huq, M.H., Musa, A.K., Sutradhar, S.R., Talukder, S.I., Debnath, C.R., 2004. Sensitivity of splenic and bone marrow aspirate study for diagnosis of kala-azar. *Mymensingh Med. J.* 13, 130–133.
- Schriefer, A., Schriefer, A.L., Goes-Neto, A., Guimaraes, L.H., Carvalho, L.P., Almeida, R.P., Machado, P.R., Lessa, H.A., de Jesus, A.R., Riley, L.W., Carvalho, E.M., 2004. Multiclonal *Leishmania braziliensis* population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis. *Infect. Immun.* 72, 508–514.
- Sheline, C., Ray, D.S., 1989. Specific discontinuities in *Leishmania tarentolae* minicircles map within universally conserved sequence blocks. *Mol. Biochem. Parasitol.* 37, 151–157.
- Solano-Gallego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J., Ferrer, L., 2001. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J. Clin. Microbiol.* 39, 560–563.
- Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miro, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., Baneth, G., 2009. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 165, 1–18.
- Troncarelli, M.Z., Camargo, J.B., Machado, J.G., Lucheis, S.B., Langoni, H., 2009. *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 164, 118–123.
- Vitale, F., Reale, S., Vitale, M., Petrotta, E., Torina, A., Caracappa, S., 2004. TaqMan-based detection of *Leishmania infantum* DNA using canine samples. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1026, 139–143.
- Watson, A.T., Penninck, D., Knoll, J.S., Keating, J.H., Sutherland-Smith, J., 2010. Safety and correlation of test results of combined ultrasound-guided fine-needle aspiration and needle core biopsy of the canine spleen. *Vet. Radiol. Ultrasound* 52, 317–322.

V. ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO

- **Artigo científico a ser submetido**

SOLCÀ, M. da S.; GUEDES, C. E. S.; BASTOS, L. A.; GONÇALVES, M. B.; BORJA, L. S.; SILVA, J. S.; LARANGEIRA, D., F.; NASCIMENTO, E. G.; OLIVEIRA, G. G. De S.; DOS-SANTOS, W.L.; FRAGA, D. B. M.; VERAS, P. S. T. Blood is the best non-invasive sample for biomolecular diagnosis of *Leishmania* infection in dogs. 2012.

O presente artigo contempla a segunda parte do estudo. Nesta, outro protocolo de qPCR tendo como alvo o kDNA do parasito foi padronizado, objetivando-se determinar qual o melhor tecido a ser empregado para o diagnóstico biomolecular da LVC, em cães com diferentes manifestações clínicas.

1 **Biomolecular Diagnosis of *Leishmania* infection Using Blood as**
2 **Non-Invasive Sample in Dogs of a Brazilian Endemic area**

3

4 Manuela da Silva Solcà¹, Carlos Eduardo Sampaio Guedes¹, Leila Andrade
5 Bastos¹, Marcelo Bordoni Gonçalves¹, Lairton Souza Borja¹, Joselli Santos
6 Silva¹, Daniela Farias Larangeira^{1,3}, Eliane Gomes Nascimento², Geraldo
7 Gileno de Sá Oliveira¹, Washington Luis Conrado dos-Santos¹, Deborah
8 Bittencourt Mothé Fraga^{1,3}, Patrícia Sampaio Tavares Veras¹

9

10 **1** Laboratório de Patologia e Biointervenção, Centro de Pesquisa Gonçalo
11 Moniz–FIOCRUZ, Salvador, BA, Brazil,

12

13 **2** Centro de Referência em Doenças Endêmicas Pirajá da Silva-PIEJ, CSU,
14 URBIS 1, Jequié, BA, Brazil,

15

16 **3** Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Medicina
17 Veterinária, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA Brazil

18

19

20 **Abstract:**

21

22 **Background:** The aim of the present study was determine which is the best-
23 suited clinical sample, for biomolecular diagnosis of canine visceral
24 leishmaniasis (CVL) in dogs with different clinical manifestations using
25 quantitative PCR (qPCR).

26 **Methodology/Principal Findings:** In a serological surveillance, sixty-one
27 stray dogs were randomly selected and classified according to the number of
28 clinical signs of CVL. All dogs were euthanized and during necropsies lymph
29 node fragments and splenic, bone marrow and blood aspirates were obtained.
30 To confirm *Leishmania* infection, ELISA and parasite culture of spleen
31 aspirates were performed. A qPCR protocol targeting the kDNA of the parasite
32 was standardized, to determine the parasite load in clinical samples.
33 Differences between parasite loads of each tissue were evaluated using
34 Friedman test ($p < 0.05$). In order to include the samples in the qPCR data

35 analysis, the DNA integrity of each sample was analyzed. This way, 52 dogs
36 fulfilled the selection criteria for DNA results for spleen, blood and lymph
37 nodes, with 24 of these dogs also fulfilling the criteria for bone marrow results.
38 Using qPCR, all the 52 dogs showed positivity, considering at least one of the
39 tissues evaluated. ELISA was positive in 83%, and culture in 35% of the dogs.
40 Parasite DNA was detected in 98.1% (51/52) of spleen samples, in 80.8%
41 (42/52) of blood samples, 53.8% (28/52) of lymph node fragments and 41.7%
42 (10/24) of bone marrow samples. Using qPCR, parasite DNA was better
43 detected in splenic aspirates in comparison with lymph node in both
44 polysymptomatic and oligosymptomatic ($p < 0.05$) dogs. No statistically
45 difference was found between blood and splenic aspirates to detect
46 *Leishmania* DNA using qPCR.

47 **Conclusion:** The spleen was the tissue with highest parasite DNA detection
48 in naturally infected dogs.

49

50 **Funding:** This work was supported by grants and fellowships from FAPESB
51 (Fundação de Amparo a Pesquisa no Estado da Bahia) and CNPq (Conselho
52 Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento).

53

54 **Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests
55 exist

56

57 *CORRESPONDING AUTHOR

58 Patrícia Sampaio Tavares Veras, PhD, MD

59 Laboratório de Patologia e Biointervenção, CPqGM, FIOCRUZ

60 Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal

61 Salvador, Bahia, Brazil; CEP: 40296-710

62 Tel: +55 (71) 3176-2263

63 Fax: +55 (71) 3176-2290

64 *Email: pveras@bahia.fiocruz.br

65

66

67

68

69 **Author Summary**

70

71 According to World Health Organization, visceral leishmaniasis is a
72 serious public health problem. The disease is caused by the parasite
73 *Leishmania infantum* and transmitted through the bites of sand flies. Infected
74 dogs are considered to be the main domestic reservoir for *Leishmania*
75 parasites, mostly because they facilitate the transmission for men and other
76 animals. In Brazil, the control strategies recommended by the Ministry of
77 Health are based mainly on identification and euthanasia of infected dogs.
78 Therefore, the diagnosis of canine visceral leishmaniasis (CVL) must be made
79 both accurately and promptly. Quantitative real time PCR (qPCR) has been
80 proven to be an extremely sensitive and specific diagnostic method that can
81 be used as a confirmatory technique for CVL. Several invasive and non-
82 invasive biological dog samples have been used for the diagnosis; however,
83 studies evaluating different tissues of infected dogs have shown variable and
84 sometimes conflicting results. In this study, the authors aimed to determine
85 which of the infected tissues analyzed (spleen, blood, lymph nodes and bone
86 marrow), shown to be more accurate for the detection of the parasite DNA
87 using a standardized qPCR technique.

88 **Introduction**

89

90 Zoonotic visceral leishmaniasis (ZVL) is a disease of great medical and
91 veterinary importance, which is endemic in Brazil as in many other countries of
92 Latin America, Asia and Europe [1]. The etiological agent of ZVL is the
93 diphasic protozoan parasite *Leishmania infantum* (syn *Leishmania chagasi*)
94 that is transmitted to vertebrate hosts through the bites of female sand flies [2-
95 4].

96 Dogs are considered the main domestic reservoir for this parasite, due to
97 their high prevalence of infection and a high degree of skin parasitism [5-8].
98 Therefore, in order to systematize control strategies, accurate and early
99 diagnosis of canine visceral leishmaniasis (CVL) is decisive to identify infected
100 animals [9,10].

101 Diagnosis of CVL can be performed using parasitological, serological or
102 molecular methods, associated with evaluation of clinical and epidemiological
103 parameters [11]. However, sensitivity of standard parasitological methods is
104 low, mainly for detection of less parasitized dogs. [12,13]. For parasite
105 detection, proper diagnosis resides mainly on parasite culture, which is a
106 laborious diagnostic technique, time-consuming, and depends on expertise of
107 the observer [14]. In addition, the sensitivity of this test can be diminished by
108 incorrect sample storage, resulting in parasite killing and sample
109 contamination. Moreover, the specific blood agar-based media for
110 promastigotes isolation is difficult to purchase, being a technique restricted to
111 specialized laboratories [11,15]. Furthermore, the lack of sensitivity or
112 specificity of some serological tests can difficult the CVL diagnosis, particularly
113 in cases of low antibody titers or cross-reactivity [9,16-18]. Hence, to
114 definitively diagnose inconclusive cases the employ of confirmatory tests can
115 be advantageous. For this proposes, molecular diagnosis for *Leishmania* sp.
116 has been proven to achieve great sensitivity and specificity when compared to
117 other conventional methods [7,19].

118 Many studies have described that quantitative real-time PCR (qPCR)
119 presents a high sensitivity in detecting low parasite loads [20-22].

120 Furthermore, qPCR has been used as a valid tool to monitor tissue parasite
121 load in dogs following anti-leishmanial drug, in countries where treatment is
122 allowed [23-25].

123 Spleen, bone marrow, lymph node and skin are the most used biological
124 samples to detect *Leishmania* sp. parasite and parasite DNA in dogs
125 [11,19,26]. In particular, the use of spleen has been proposed because is
126 considered a key site for the parasite multiplication in both asymptomatic and
127 symptomatic, naturally infected dogs [26,27]. Barrouin-Melo et al. [28]
128 proposed the use of spleen instead of lymph node samples for the diagnosis
129 of CVL infection, due to the high sensitivity in detecting parasite in these
130 samples. Nonetheless, obtaining spleen samples is a costly invasive
131 procedure, since even well tolerated by animals, it is less tolerated by the
132 owners [29-31]. Therefore, blood and conjunctival swab have been used as
133 alternative non-invasive samples for molecular diagnosis of CVL [21,31,32].

134 A comprehensive study comparing the efficacy in detection of parasite
135 DNA using qPCR, in a large number of samples obtained at the same time,
136 from each natural infected dog, has not been performed. The aim of this study
137 was determine which is the best-suited sample, among spleen, lymph node,
138 bone marrow and blood, for biomolecular diagnosis of CVL in dogs with
139 different clinical manifestations using qPCR.

140

141 **Materials and methods**

142 **Ethics Statement**

143 In the present study, all the experiments using dogs were performed in
144 agreement with Brazilian Federal Law on Animal Experimentation (Law
145 11794) [33], with the Oswaldo Cruz Foundation guidelines for research with
146 animals [34], and with the manual for the surveillance and control of visceral
147 leishmaniasis [35]. The Ethics Committee for Animal Experimentation of
148 CPqGM-FIOCRUZ approved this study, protocol CEUA 015/2009. Sera and
149 spleen biopsies of negative controls dogs were obtained with the owner

150 consent, signing the Informed Consent Form before sample and data
151 collection.

152

153 Dogs

154 Sixty-one stray dogs of both sexes were captured in July 2010 in an
155 endemic area for CVL, the municipality of Jequié, located in the State of Bahia
156 (BA), Brazil. The dogs were captured randomly by the city health department
157 agents within a week. The stray dogs were submitted to clinical and
158 serological (ELISA) evaluation for CVL. Dogs were clinically classified
159 according to the presence or absence of common clinical signs of CVL,
160 including: weight loss, alopecia, cutaneous lesions, conjunctivitis,
161 onichogryphosis and lymphadenopathy. According to Mancianti et al. [36] in
162 the absence of any observable signs, dogs were considered to be
163 asymptomatic; in the presence of one to three clinical signs, dogs were
164 classified as oligosymptomatic, in the presence of three or more signs, dogs
165 were determined to be polysymptomatic. A total of 20 healthy dogs from a
166 municipality of Pelotas, a non-endemic area for CVL in Rio Grande do Sul
167 (RS), Brazil, were used as negative controls dogs. The total of these dogs
168 presented no clinical signs for CVL and tested negative in both ELISA and
169 splenic culture.

170

171 ELISA and Spleen Culture

172 ELISA technique was performed as previously described [37,38]. Each
173 sera sample was assayed in duplicate in the plate, and assay was repeated
174 three times. Parasitological evaluation was performed by culturing part of the
175 spleen aspirates collected during necropsy, for a period of 4 weeks in Novy–
176 MacNeal–Nicolle (NNN) biphasic medium at 23°C, supplemented with 20%
177 FBS (Fetal Bovine Serum – Gibco BRL, New York, USA) and 100µg/mL
178 gentamicin to avoid contamination (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) [39].
179 For parasite identification, microscopic observations were performed at weekly

180 intervals for no less than 4 weeks. Each splenic culture was prepared
181 separately and individually, with identification double-checking.

182

183 Sampling

184 Prior to sample collection, all the dogs were anesthetized with
185 acepromazine (0.1 mg/kg IV, Acepram 1%, Vetnil Brazil) and sodium
186 thiopental (15 mg/kg IV, Thiopentax 1g Cristália, Brazil) and then euthanized
187 using a supersaturated solution of potassium chloride (2 ml/kg). The
188 clinical samples, corresponding to spleen, blood, and lymph node fragments,
189 as well as bone marrow aspirates were obtained during necropsy. All the
190 samples were collected using sterile needles and blades, and were stored in
191 DNAase- and RNAase-free tubes at -70°C until DNA extraction.

192

193 DNA extraction

194 DNA from each sample was extracted using a DNeasy® Blood & Tissue
195 Kit (Qiagen, Hilden, Germany) in accordance with manufacturer protocols. A
196 total of 200 µL of spleen and bone marrow aspirates, and 20 mg of lymph
197 node fragment, were processed following the Qiagen animal tissue protocol,
198 while 200 µL of blood were processed following the Qiagen animal blood
199 protocol. Once extracted, the quality and concentration of each DNA sample
200 was determined using a digital spectrophotometer (NanoDrop® ND-1000,
201 Thermo Scientific, Wilmington, USA). Samples with poor DNA concentration
202 and 280/260 and 230/260 ratios, were excluded from the qPCR tissue
203 compared analysis. The DNA samples were then adjusted to a concentration
204 of 30 ng/µL, aliquoted and stored at -20°C until qPCR assay was performed.

205

206

207 Quantitative PCR (qPCR)

208 **Quantification of *Leishmania* kDNA.** Quantitative PCR was used to
209 determine parasitic DNA amounts in tissue samples from dogs. First PCR
210 assays were performed using an amplification procedure previously described
211 [21]. The PCR technique targeted a conserved region of *L. infantum* kDNA to
212 obtain a 120-bp amplicon. Reactions were performed at a final volume of 25
213 μL , containing: 5 μl of 30 ng/ μL of DNA sample diluted in deionized water and
214 20 μl of PCR mixture, which consisted of 12.5 μl of Universal Mastermix
215 (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), forward primer 5'-
216 AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-3' (LEISH-1) and reverse primer 5'-
217 ACCCCCAGTTTCCCGCC- 3' (LEISH-2) both at a final concentration of 900
218 nM, and a fluorogenic probe 5'-AAAAATGGGTGCAGAAAT-3' which was
219 synthesized using a FAM reporter molecule attached to the 5' end, as well as
220 a MGB-NFQ, quencher linked to the 3'-end (Perkin-Elmer Applied
221 Biosystems), at a final concentration of 200 nM. Next, quantification of
222 *Leishmania* DNA was achieved using an absolute method based on
223 comparison of threshold cycle (CT) values with those from a standard curve
224 constructed from ten-fold serial dilutions of *L. infantum* DNA extracted from
225 cultured parasites (strain MHOM/BR/2000/MER2), ranging from 10^5 to 10^{-1}
226 parasites, with each dilution performed in triplicate on every plate.
227 Amplification was then performed in triplicate for each sample, as well as a
228 negative control, using an ABI Prism 5900 sequence detection system
229 (Perkin-Elmer Applied Biosystems). The cycling parameters were 50°C for
230 2min, 95°C for 10min, and 40 cycles at 95°C for 15s and 60°C for 1min. In
231 order to minimize interplate variations, the values from each plate were
232 normalized using a common threshold line. Next, a threshold cycle value (Ct)
233 was calculated for each sample by determining the point at which the
234 fluorescence generated within a given reaction has exceeded the threshold
235 line. The Ct cut-off value for *Leishmania* kDNA amplification values was
236 determined by testing in the same plate, DNA samples from 20 healthy dogs
237 from Pelotas (RS), and from 20 infected dogs from Jequié (BA). Then, each
238 sample Ct was considered positive or negative according to the cut-off value
239 that was determined using a Receiver-Operator Characteristic (ROC) curve

240 (see subitem 9. Statistic). Samples which presented a Ct lower than the Ct
241 cut-off, where considered positive. If the standard deviation of the triplicate
242 was >0.38 , the sample was reanalyzed using qPCR [40].

243

244 **Quantification of the 18S rRNA canine gene.** Amplification of canine
245 housekeeping gene (18S rRNA) was used in order to normalize the
246 concentration of input sample DNA, as well as to ensure that negative results
247 was not related to sample problems, including absence of host cells in
248 aspiration samples, DNA degradation, low amount of loaded DNA, and
249 presence in the sample of PCR inhibitors [41]. To amplify the 18S rRNA gene
250 as an internal reference of canine genomic DNA, pre-developed TaqMan
251 assay reagents (Perkin-Elmer Applied Biosystems) were used. The primers'
252 target 18S RNA genes in mammals but does not amplify *Leishmania* genomic
253 DNA. The reactions were performed at a final volume of 25 μL , containing: 5
254 μl of 30 ng/ μL of DNA canine sample diluted in deionized water and 20 μl of
255 PCR mixture, which consisted of 12.5 μl of Universal Mastermix (Perkin-Elmer
256 Applied Biosystems), and 1.25 μl of 18S GeneEx Assay (Perkin-Elmer Applied
257 Biosystems) at a concentration of 20x, and deionized water was added by a
258 final volume of 25 μL . Standard curves were prepared for the housekeeping
259 gene, ranging from 450 to 18.75 ng, with each dilution performed in triplicate
260 on every plate. Amplification reaction was also performed for each sample in
261 triplicate, using an ABI Prism 5900 sequence detection system (Perkin-Elmer
262 Applied Biosystems). The cycling parameters were 50°C for 2min, 95°C for
263 10min, and 40 cycles at 95°C for 15s and 60°C for 1min. For each sample, the
264 amount of target and housekeeping genes was determined comparing Ct
265 values with the appropriate standard curve. The slope of the standard curves
266 for 18s rRNA gene was calculated and corresponded to -3.399 (SD 0.296),
267 which represents the mean slope values of 11 independent experiments with a
268 corresponded correlation coefficient (r^2) of 0.990 (SD 0.007). Samples that
269 were positive for 18S rRNA gene were used to determine parasite load in
270 positive samples for the *Leishmania* kDNA, whereas 18s rRNA negative
271 samples were excluded from the study. Parasite load was expressed as the

272 number of parasites normalized by 100 mg of amplified 18S rRNA
273 housekeeping gene in host tissue [42].

274

275 Decontamination procedures

276 Due to the extremely high degree of sensitivity inherent in qPCR
277 techniques, special care was taken to avoid any contamination of the DNA
278 samples during all procedures. To prevent carryover contamination by
279 previously amplified DNA, filter tips were routinely used in all DNA extraction
280 steps, as well as during qPCR. In addition, the laminar flow hood and all
281 utilized materials were decontaminated by UV radiation before and after each
282 procedure. For qPCR amplification procedure, the PCR mixture was first
283 placed in each well, followed by a dilution containing either sample DNA, or *L.*
284 *infantum* DNA. The qPCR protocol utilized negative controls in order to
285 confirm the absence of contamination.

286

287 Statistic

288 Databases were built using Excel (Microsoft Office), and Epi-info TM
289 3.5.1 (Centers for Disease Control and Prevention – CDC, USA). The
290 statistical analyses were performed using the GraphPad prism software v.5.0
291 (GraphPad Prism Inc., San Diego, CA). ROC curve was built with Ct results of
292 the positive and negative spleen samples groups to establish the Ct cut-off
293 value, which presented the highest sensitivity and specificity in the prediction
294 of *Leishmania* sp. infection. The differences between parasite loads of each
295 tissue from oligo and polysymptomatic dogs were evaluated using Friedman
296 test ($p < 0.05$). Friedman's with Dunn's multiple comparisons test was
297 performed to estimate differences of parasite load values between three or
298 more samples. For all tests, results presenting $p \leq 0.05$ were considered
299 statistically significant.

300

301 **Results**

302 Standardization of qPCR for *Leishmania* kDNA

303 In order to determine the detection limit between a positive and negative
304 test using qPCR analysis, a ROC curve (AUC=1, $p < 0.001$) was constructed
305 (see Materials & Methods section). This curve showed a specificity of 95% (CI
306 75.13 – 99.87) and a sensitivity of 100% (CI 83.16-100) with a likelihood ratio
307 of 20 (Figure 1). The estimated detection limit corresponded to Ct cut-off value
308 of 37.0, corresponding to 0.016 parasites per reaction. The slope of the
309 standard curve for *Leishmania* kDNA gene was calculated and corresponded
310 to – 3.657 (SD 0.148), which represents the mean slope values of 9
311 independent experiments with a corresponded correlation coefficient (r^2) of
312 0.998 (SD 0.004).

313

314 Parasite DNA detection in different dog samples

315 For qPCR analysis, tissue samples were obtained from 61 dogs. From
316 these, nine DNA samples were excluded because of failure of correct
317 amplification. Clinical examination revealed that 63.5% (33/52) of the dogs
318 was classified as oligosymptomatic and 36.5% (19/52) as polysymptomatic.
319 Interestingly, any of the dogs, captured in this compulsory euthanasia
320 program, presented no signs upon clinical examination. *Leishmania* parasite
321 cultures tested positive in 18 out of the 52 (34.6%) spleen samples. Anti-
322 *Leishmania* antibodies were detected in 82.7% (43/52) of canine serum
323 samples tested by ELISA. Then, qPCR was performed using spleen, blood
324 and lymph node samples from the total of the 52 dogs (100%) and bone
325 marrow samples from 24 out of the 52 dogs (46.2%). Parasite DNA was
326 detected in 100% (52/52) of the animals in at least one of the tested samples.
327 Positivity rates of each test used for diagnosis of *Leishmania* infection are
328 depicted in Figure 2.

329 Among the tissue analyzed using qPCR, parasite DNA was highly
330 detected in splenic aspirates. Indeed, spleen aspirates tested positive in 51

331 out of the 52 samples (98.1%), blood in 42 out of 52 samples (80.8%), lymph
332 node in 28 out of 52 samples (53.8%), and bone marrow in 10 out of 24
333 samples (41.7%)(Figure 3).

334 Parasite load in different tissue samples

335 Parasite DNA in samples was quantified in order to assesses a possible
336 correlation between parasite load in any of the tissue analyzed and frequency
337 of clinical sings. First we evaluated whether parasite loads differ among the
338 tissue analyzed. The qPCR analysis revealed that parasite load was higher in
339 spleens than lymph nodes from either oligo ($p = 0.009$) or polysymptomatic
340 dogs ($p = 0.04$) (Figure 4A). In addition, parasite load in bone marrow samples
341 was statistically different from that in spleen samples from oligosymptomatic
342 animals ($p = 0.025$) (Figure 4B). Thereafter, the authors hypothesized that
343 there is a direct correlation between parasite load in each infected tissues and
344 number of clinical sings. In disagreement with this hypothesis, parasite load
345 shown to be similar between oligo and polysymptomatic dogs, independently
346 of tissue analyzed.

347

348 **Discussion**

349 In last few years, several qPCR methods have been developed for
350 parasite detection and diagnosis of CVL [20,23,42]. However, these methods
351 presented considerable variations from each other, with divergent results
352 concerning different canine clinical samples [43]. These variations depend on
353 several factors such as: lack of standardization of parasite gene amplification
354 against the constitutive mammal gene and lack of standardization in
355 determining the parasite load of the tissues. In this study, we analyzed the
356 parasite load of spleen, blood, bone marrow and lymph node of dogs,
357 assessing the DNA integrity and normalizing the results against the
358 constitutive mammal gene. Interestingly, according to our selection criteria, we
359 had to exclude almost 15% of the samples.

360 The qPCR protocol targeting kDNA was more accurate in the detection
361 of *Leishmania* parasites in dogs, when compared to ELISA and parasitological
362 culture. The qPCR was the technique with the best positivity rate among the
363 employed. Similar results were obtained by others studies, which higher
364 positivity rates were achieved using molecular techniques. These findings
365 reinforce the notion that in endemics areas, the number of infected dogs
366 detected by serological surveys is underestimated [9,16,44]. In addition, this
367 indicates that false-negative animals are not detected and consequently not
368 removed, allowing maintenance of the infection in endemic areas [16,45]. This
369 misleading situation can be prevented implementing other diagnostic tests
370 with higher specificity and sensitivity, such as qPCR.

371 In our findings, spleen samples presented higher positivity rate and
372 higher parasite load, when compared with the other clinical samples. This can
373 be explained by the fact that spleen becomes an important site of interaction
374 between the immune system and the *Leishmania* during the course of VL [46].
375 Moreover it has been demonstrated that the spleen maintains the infection
376 during the entire course of CVL [47].

377 Positivity rate of blood sample was higher than lymph node and bone
378 marrow, being surmounted only by spleen sample, although blood parasite
379 load was lower when compared to the other tissue samples. Different from the
380 results presented herein, several studies found bone marrow and lymph nodes
381 with higher positivity rate than blood [21,41,48,49]. Quaresma et al. [50] on the
382 other hand, found similar positivity rates in blood and bone marrow samples. It
383 appears that the qPCR protocol used in this study displayed higher specificity
384 and sensitivity, because even with low blood parasite load, the technique was
385 able to detect *Leishmania* DNA in this sample.

386 Some authors considered the blood as a poor source of *Leishmania*
387 DNA [51,52]. Mostly due to the fact that blood samples had not shown good
388 detection results using conventional PCR (cPCR). The cause of such poor
389 results may reside in the high frequency of PCR inhibitors found in this
390 sample, and low parasite load, which may lead to false negative results
391 especially in asymptomatic dogs [44]. In this study, parasite load in blood

392 sample, demonstrated no statistically difference from that in spleen. This is a
393 promissory result for a non-invasive sample as blood for employing in
394 detection of *Leishmania* infection in dogs. In agreement with the present
395 results, Francino et al. [21] demonstrated that blood might be sufficient for the
396 diagnosis of infection of *Leishmania* by qPCR due to the ability of this
397 technique for quantifying extremely low levels of parasitemia.

398 In our study we attempted to assess if there was any difference
399 between the parasite load found in oligo and polysymptomatic dogs. Some
400 studies demonstrated correlation between clinical manifestations of CVL and
401 parasite load in spleen and lymph node [22,39,53]. While others studies have
402 shown that clinical manifestations of CVL do not necessarily correlate with the
403 parasite load [54,55]. In contradiction, the present study revealed that parasite
404 load between oligosymptomatic and polysymptomatic dog was not significantly
405 different in each of the tissue analyzed. Although, comparing different tissues,
406 oligosymptomatic dogs tend to have a higher spleen parasite load when
407 compared to lymph node and bone marrow. Polysymptomatic dogs also tend
408 to present a higher spleen parasite load compared to lymph node. Reis et al.
409 [47], found positive correlation between parasite density in the spleen and skin
410 smears from asymptomatic to symptomatic dogs. Perhaps, our negative
411 findings are due to the absence of asymptomatic dogs in the randomly
412 captured animal population.

413 In the present study, splenic aspirates have shown to be the most sensitive
414 tissue for *Leishmania* DNA detection using qPCR (Figure 3), however
415 *Leishmania* DNA detection in blood samples showed no statistical difference
416 from spleen samples. In our experience, spleen aspirate procedure has been
417 well tolerated, even in the most severely affected dogs. Nevertheless, splenic
418 collection is still considered an invasive procedure that needs the use of
419 ultrasound device to make it safer [29,56]. Thus, blood, when compared to
420 spleen sample, is preferred in epidemiological evaluations, for several reasons
421 including: it is less invasive, is easier and rapidly obtained, less expensive and
422 well accepted by the dog owners [26,30,31,57]. In sum, the results presented
423 herein indicate that the less invasive blood sample shown to be a good

424 alternative tissue for *Leishmania* DNA detection in symptomatic dogs using
425 qPCR.

426

427 **Acknowledgements**

428 The authors would like to thank Andris K. Walter for providing English
429 revision and consulting services.

430

431 **Author Contributions**

- 432 • Conceived and designed the experiments: PSTV/ DBMF/MSS
- 433 • Performed the experiments: MSS/LAB/MBG/LSB/DFL/JSS
- 434 • Analyzed the data: MSS/CESG/DSWL/GGSO/DBMF/PSTV
- 435 • Contributed reagents/materials/analysis tools:
436 MSS/LAB/MBG/LSB/DFL/JSS/ESN
- 437 • Wrote the paper: MSS/CESG/DBMF/PSTV

438 **References**

439

- 440 1. Desjeux P (2004) Leishmaniasis. *Nat Rev Microbiol* 2: 692.
- 441 2. Lainson R, Shaw JJ (1978) Epidemiology and ecology of leishmaniasis in
442 Latin-America. *Nature* 273: 595-600.
- 443 3. Killick-Kendrick R (1999) The biology and control of phlebotomine sand
444 flies. *Clin Dermatol* 17: 279-289.
- 445 4. Kuhls K, Alam MZ, Cupolillo E, Ferreira GE, Mauricio IL, et al. (2011)
446 Comparative microsatellite typing of new world *Leishmania infantum*
447 reveals low heterogeneity among populations and its recent old world
448 origin. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e1155.
- 449 5. Deane LM, Deane MP (1955) Leishmaniose visceral urbana (no cão e no
450 homem) em Sobral, Ceará. *O Hospital* 47: 113-128.
- 451 6. Molina R, Amela C, Nieto J, San-Andres M, Gonzalez F, et al. (1994)
452 Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to
453 colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88:
454 491-493.
- 455 7. Gramiccia M, Gradoni L (2005) The current status of zoonotic
456 leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol* 35:
457 1169-1180.
- 458 8. Dye C (1996) The logic of visceral leishmaniasis control. *Am J Trop Med
459 Hyg* 55: 125-130.
- 460 9. Coura-Vital W, Marques MJ, Veloso VM, Roatt BM, Aguiar-Soares RD, et
461 al. (2011) Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum*
462 infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular
463 methods. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e1291.
- 464 10. Podaliri Vulpiani M, Iannetti L, Paganico D, Iannino F, Ferri N (2011)
465 Methods of Control of the *Leishmania infantum* Dog Reservoir: State of
466 the Art. *Vet Med Int* 2011: 215964.
- 467 11. Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G (2008) Canine
468 leishmaniosis--new concepts and insights on an expanding zoonosis:
469 part two. *Trends Parasitol* 24: 371-377.
- 470 12. Moreira MA, Luvizotto MC, Garcia JF, Corbett CE, Laurenti MD (2007)
471 Comparison of parasitological, immunological and molecular methods
472 for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs.
473 *Vet Parasitol* 145: 245-252.
- 474 13. Ndao M (2009) Diagnosis of parasitic diseases: old and new approaches.
475 *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2009: 278246.
- 476 14. Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, et al.
477 (2009) Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and
478 prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* 165: 1-18.
- 479 15. Paltrinieri S, Solano-Gallego L, Fondati A, Lubas G, Gradoni L, et al.
480 (2010) Guidelines for diagnosis and clinical classification of
481 leishmaniasis in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 236: 1184-1191.
- 482 16. Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L (2001)
483 Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of
484 canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and
485 serology. *J Clin Microbiol* 39: 560-563.

- 486 17. Ferreira Ed, C., de Lana M, Carneiro M, Reis AB, Paes DV, et al. (2007)
487 Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral
488 leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet*
489 *Parasitol* 146: 235-241.
- 490 18. Troncarelli MZ, Camargo JB, Machado JG, Lucheis SB, Langoni H (2009)
491 *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from
492 endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. *Vet*
493 *Parasitol* 164: 118-123.
- 494 19. Solcà MdS, Guedes CE, Nascimento EG, Oliveira GG, dos Santos WL, et
495 al. (2012) Qualitative and quantitative polymerase chain reaction (PCR)
496 for detection of *Leishmania* in spleen samples from naturally infected
497 dogs. *Vet Parasitol* 184: 133-140.
- 498 20. Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H (2004) Quantification of
499 *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high
500 sensitivity. *J Clin Microbiol* 42: 5249-5255.
- 501 21. Francino O, Altet L, Sanchez-Robert E, Rodriguez A, Solano-Gallego L, et
502 al. (2006) Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and
503 monitoring of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* 137: 214-221.
- 504 22. Manna L, Reale S, Vitale F, Gravino AE (2009) Evidence for a relationship
505 between *Leishmania* load and clinical manifestations. *Res Vet Sci* 87:
506 76-78.
- 507 23. Maia C, Campino L (2008) Methods for diagnosis of canine leishmaniasis
508 and immune response to infection. *Vet Parasitol* 158: 274-287.
- 509 24. Pennisi MG, Reale S, Giudice SL, Masucci M, Caracappa S, et al. (2005)
510 Real-time PCR in dogs treated for leishmaniasis with allopurinol. *Vet*
511 *Res Commun* 29 Suppl 2: 301-303.
- 512 25. Martinez V, Quilez J, Sanchez A, Roura X, Francino O, et al. (2011)
513 Canine leishmaniasis: the key points for qPCR result interpretation.
514 *Parasit Vectors* 4: 57.
- 515 26. Maia C, Afonso MO, Neto L, Dionisio L, Campino L (2009) Molecular
516 detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Phlebotomus*
517 *perniciosus* from Algarve region, Portugal. *J Vector Borne Dis* 46: 268-
518 272.
- 519 27. Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Guerra LL, Carvalho MG, et
520 al. (2006) Phenotypic features of circulating leucocytes as
521 immunological markers for clinical status and bone marrow parasite
522 density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Clin Exp*
523 *Immunol* 146: 303-311.
- 524 28. Barrouin-Melo SM, Lorangeira DF, de Andrade Filho FA, Trigo J, Juliao
525 FS, et al. (2006) Can spleen aspirations be safely used for the
526 parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniosis? A study on
527 asymptomatic and polysymptomatic animals. *Vet J* 171: 331-339.
- 528 29. Carvalho D, Oliveira TMFS, Baldani CD, Machado RZ (2009) An enzyme-
529 linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of IgM
530 antibodies against *Leishmania chagasi* in dogs. *Pesq Vet Bras* 29: 120-
531 124.
- 532 30. Aoun O, Mary C, Roqueplo C, Marie JL, Terrier O, et al. (2009) Canine
533 leishmaniasis in south-east of France: screening of *Leishmania*
534 *infantum* antibodies (western blotting, ELISA) and parasitaemia levels
535 by PCR quantification. *Vet Parasitol* 166: 27-31.

- 536 31. Lombardo G, Pennisi MG, Lupo T, Migliazzo A, Capri A, et al. (2012)
537 Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral
538 and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic
539 techniques. *Vet Parasitol* 184: 10-17.
- 540 32. Ferreira SdA, Ituassu LT, de Melo MN, de Andrade AS (2008) Evaluation
541 of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by
542 PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol* 152: 257-
543 263.
- 544 33. República Pd (2008) Procedimentos para o uso científico de animais. In:
545 Jurídicos CCSpA, editor. Brasília.
- 546 34. FIOCRUZ (2008) Manual de utilização de animais / FIOCRUZ. In: CEUA
547 Cdénudade-, editor. 1 ed. Rio de Janeiro: MINISTÉRIO DA SAÚDE.
- 548 35. Brasil (2006) Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral.
549 In: Epidemiológica DdVn, editor. Brasília: Ministério da Saúde e
550 Secretaria de Vigilância em Saúde.
- 551 36. Mancianti F, Gramiccia M, Gradoni L, Pieri S (1988) Studies on canine
552 leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms
553 of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans R Soc*
554 *Trop Med Hyg* 82: 566-567.
- 555 37. Baleeiro CO, Paranhos-Silva M, dos Santos JC, Oliveira GG, Nascimento
556 EG, et al. (2006) Montenegro's skin reactions and antibodies against
557 different *Leishmania* species in dogs from a visceral leishmaniosis
558 endemic area. *Vet Parasitol* 139: 21-28.
- 559 38. Paranhos-Silva M, Freitas LA, Santos WC, Grimaldi GJ, Pontes-de-
560 Carvalho LC, et al. (1996) A cross-sectional serodiagnostic survey of
561 canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg*
562 55: 39-44.
- 563 39. Barrouin-Melo SM, Lorangeira DF, Trigo J, Aguiar PH, dos-Santos WL, et
564 al. (2004) Comparison between splenic and lymph node aspirations as
565 sampling methods for the parasitological detection of *Leishmania*
566 *chagasi* infection in dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 195-197.
- 567 40. Naranjo C, Fondevila D, Altet L, Francino O, Rios J, et al. (2011)
568 Evaluation of the presence of *Leishmania* spp. by real-time PCR in the
569 lacrimal glands of dogs with leishmaniosis. *Vet J*.
- 570 41. Solano-Gallego L, Rodriguez-Cortes A, Trotta M, Zampieron C, Razia L, et
571 al. (2007) Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-
572 time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniosis. *Vet*
573 *Parasitol* 147: 315-319.
- 574 42. Manna L, Reale S, Viola E, Vitale F, Manzillo VF, et al. (2006) *Leishmania*
575 DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally
576 infected dogs. *Vet Parasitol* 142: 271-280.
- 577 43. Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L (2008)
578 Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding
579 zoonosis: part one. *Trends Parasitol* 24: 324-330.
- 580 44. Lachaud L, Chabbert E, Dubessay P, Dereure J, Lamothe J, et al. (2002)
581 Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral
582 leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. *Parasitology*
583 125: 197-207.
- 584 45. Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Shaw JJ, Dye C (2002)
585 Infectiousness in a cohort of brazilian dogs: why culling fails to control

- 586 visceral leishmaniasis in areas of high transmission. J Infect Dis 186:
587 1314-1320.
- 588 46. Santana CC, Vassallo J, de Freitas LA, Oliveira GG, Pontes-de-Carvalho
589 LC, et al. (2008) Inflammation and structural changes of splenic
590 lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected
591 dogs. Parasite Immunol 30: 515-524.
- 592 47. Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Carvalho MG, Mayrink W,
593 et al. (2006) Parasite density and impaired biochemical/hematological
594 status are associated with severe clinical aspects of canine visceral
595 leishmaniasis. Res Vet Sci 81: 68-75.
- 596 48. Manna L, Gravino AE, Picillo E, Decaro N, Buonavoglia C (2008)
597 *Leishmania* DNA quantification by real-time PCR in naturally infected
598 dogs treated with miltefosine. Ann N Y Acad Sci 1149: 358-360.
- 599 49. Maia C, Nunes M, Cristovao J, Campino L (2010) Experimental canine
600 leishmaniasis: clinical, parasitological and serological follow-up. Acta
601 Trop 116: 193-199.
- 602 50. Quaresma PF, Murta SM, Ferreira Ede C, da Rocha-Lima AC, Xavier AA,
603 et al. (2009) Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis:
604 identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of
605 parasite DNA by real-time PCR. Acta Trop 111: 289-294.
- 606 51. Reale S, Maxia L, Vitale F, Glorioso NS, Caracappa S, et al. (1999)
607 Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node
608 aspirates and blood. J Clin Microbiol 37: 2931-2935.
- 609 52. Silva DA, Madeira MF, Teixeira AC, de Souza CM, Figueiredo FB (2011)
610 Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs
611 euthanized by the leishmaniasis control program. Vet Parasitol 179:
612 257-261.
- 613 53. Sanchez MA, Diaz NL, Zerpa O, Negron E, Convit J, et al. (2004) Organ-
614 specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of
615 symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania*
616 *chagasi*. Am J Trop Med Hyg 70: 618-624.
- 617 54. Tafuri WL, de Oliveira MR, Melo MN, Tafuri WL (2001) Canine visceral
618 leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case
619 reported from Brazil. Vet Parasitol 96: 203-212.
- 620 55. Abranches P, Campino L, Santos-Gomes GM (1998) [Canine
621 leishmaniasis. New concepts of epidemiology and immunopathology:
622 their impact in the control of human visceral leishmaniasis]. Acta Med
623 Port 11: 871-875.
- 624 56. Watson AT, Penninck D, Knoll JS, Keating JH, Sutherland-Smith J (2011)
625 Safety and correlation of test results of combined ultrasound-guided
626 fine-needle aspiration and needle core biopsy of the canine spleen. Vet
627 Radiol Ultrasound 52: 317-322.
- 628 57. de Almeida Ferreira S, Leite RS, Ituassu LT, Almeida GG, Souza DM, et
629 al. (2012) Canine skin and conjunctival swab samples for the detection
630 and quantification of *Leishmania infantum* DNA in an endemic urban
631 area in Brazil. PLoS Negl Trop Dis 6: e1596.
- 632
633
634

635 **Figure Legends**

636

637

638 **Figure 1. ROC curve of Ct cut-off determination for the prediction of**
639 ***Leishmania* sp. infection.** A ROC curve was built using *Leishmania* kDNA
640 qPCR Ct results of the positive and negative canine spleen samples. Samples
641 were tested in duplicate in the same plate. The Ct cut-off value was
642 determined in 37.0 (AUC=1, $p < 0.0001$), showing a specificity of 95% (CI
643 75.13 – 99.87) and a sensitivity of 100% (CI 83.16-100) with a likelihood ratio
644 of 20.

645

646

647 **Figure 2. Positivity rate (%) of the diagnostic methods for CVL employed**
648 **in the 52 stray dogs.** Results of qPCR, ELISA and spleen culture for the
649 diagnostic of *Leishmania* sp. infection. qPCR results contemplate positivity in
650 at least one sample.

651

652

653

654

655 **Figure 3. qPCR positivity rate (%) of tissue samples collected from the**
656 **52 naturally infected stray dogs.** *Leishmania* kDNA qPCR positivity rate for
657 spleen, blood and lymph node was assessed in 52 animals. qPCR in Bone
658 marrow was performed in 24 animals. Sample was considered positive when
659 the triplicate Ct mean < 37.00 .

660

661

662 **Figure 4 Parasite load in different tissues from oligo and**
663 **polysymptomatic dogs.** Amount of parasite load (n° of parasite /100 mg
664 DNA) detected by *Leishmania* kDNA qPCR in lymph node, spleen and blood
665 of 52 naturally infected stray dogs (panel **A**). Parasite load in lymph node,
666 spleen blood and bone marrow of 24 naturally infected stray dogs (panel **B**).
667 The parasite load is stratified by clinical manifestation. Horizontal lines
668 represent the median values for each group. Asterisks indicate values that are
669 statistically significant ($* = p < 0.05$; $** = p < 0.01$) from the other tissues using
670 Friedman's with Dunn's multiple comparisons test.

671

Figure 1

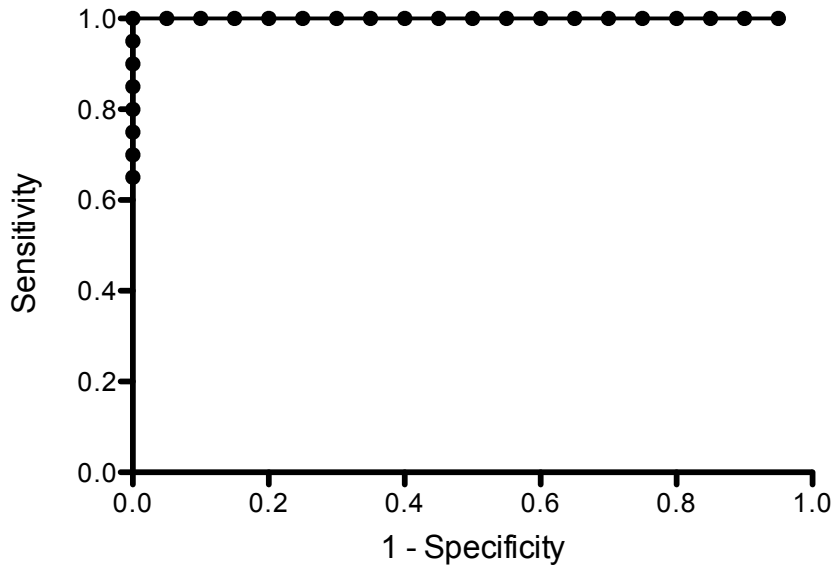


Figure 2

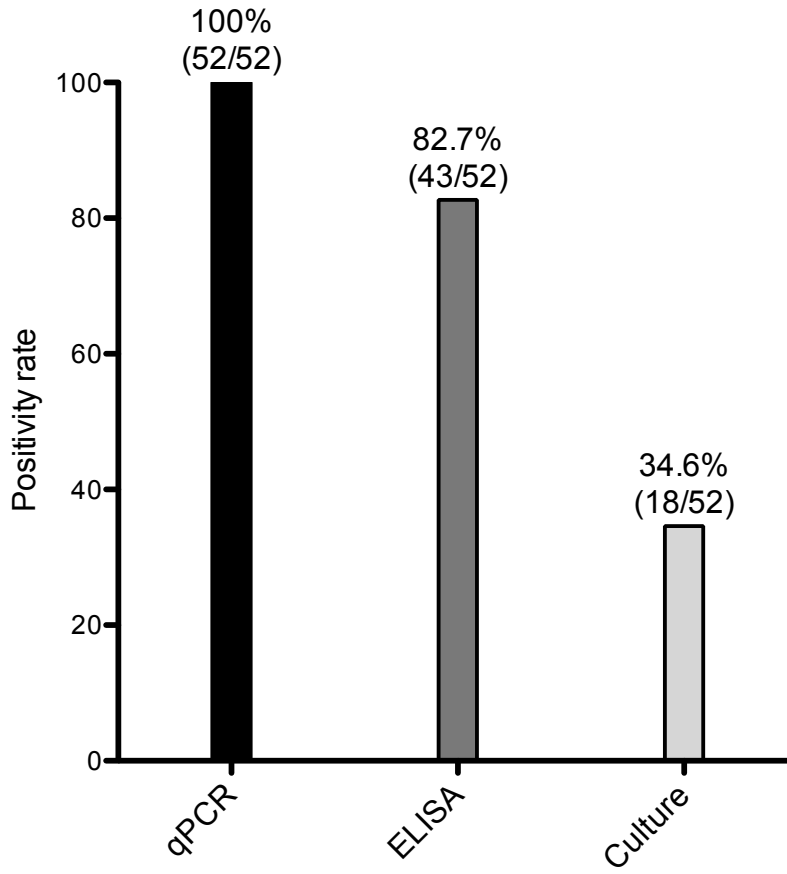


Figure 3

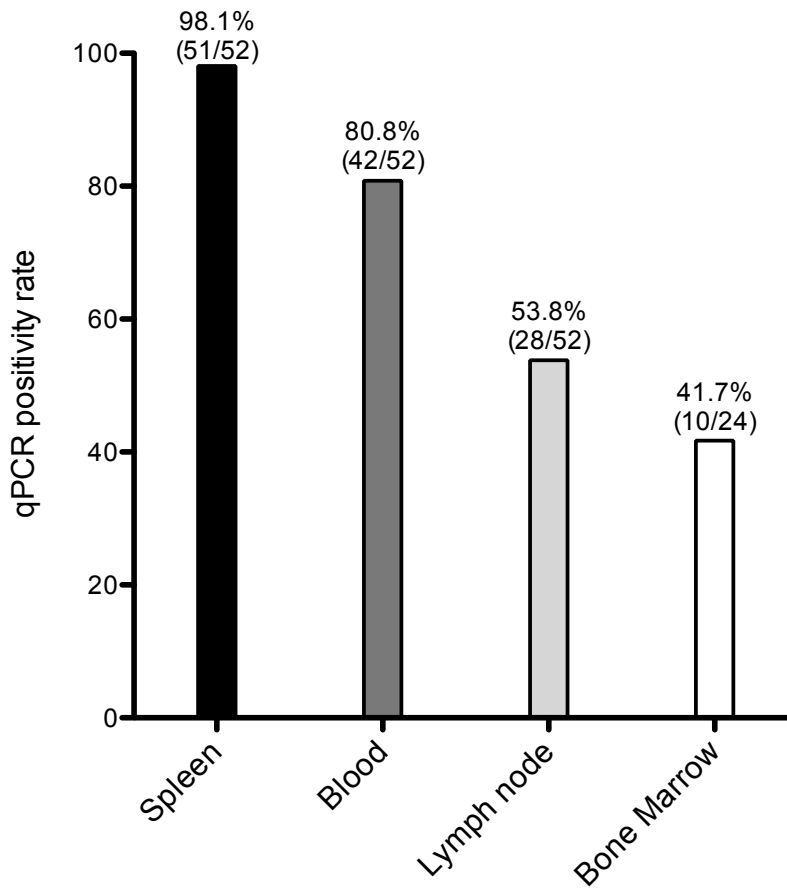
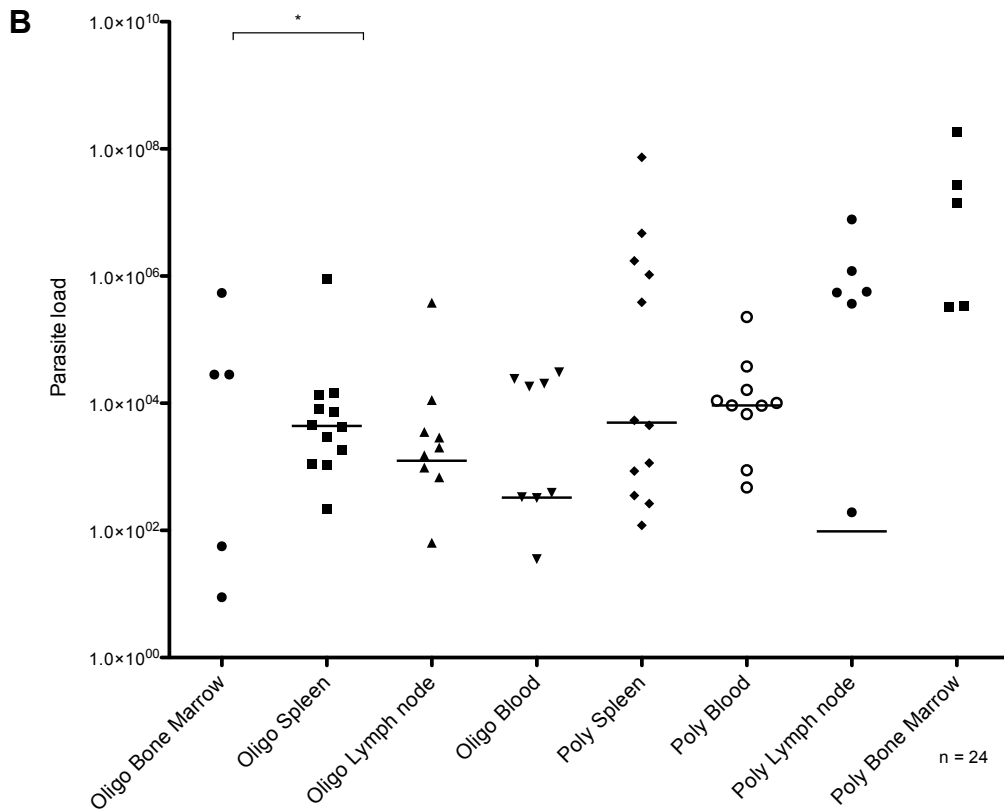
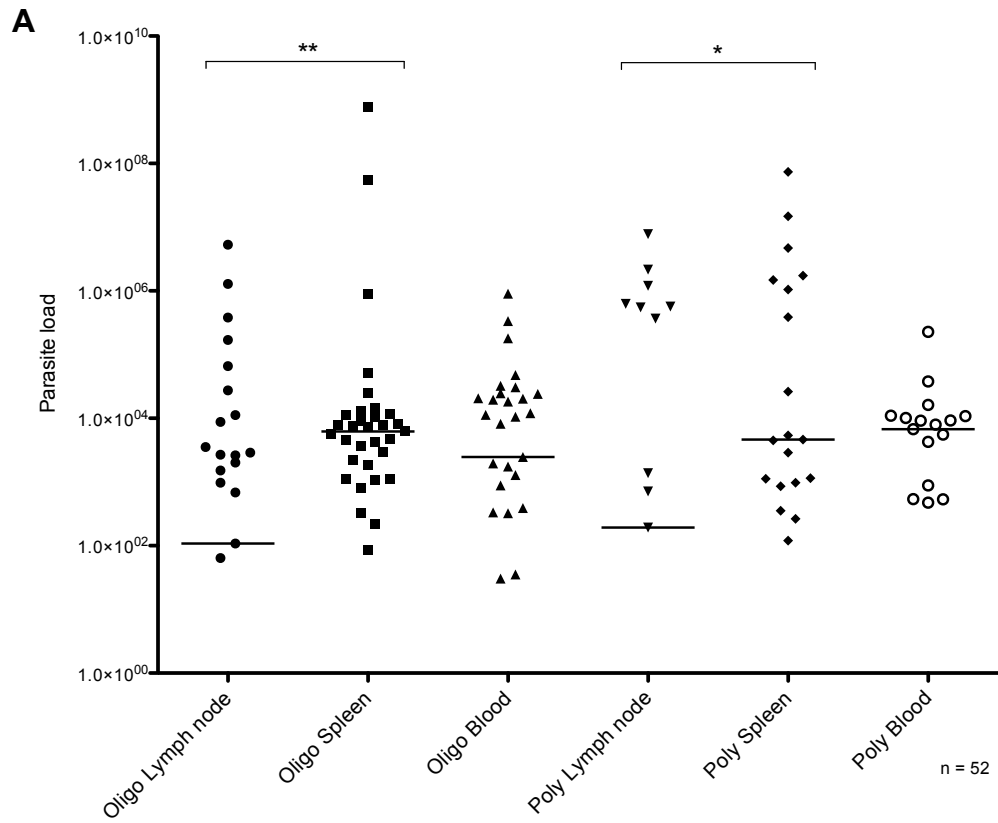


Figure 4



VI. RESUMO DE RESULTADOS

- A qPCR tendo como alvo o kDNA de *Leishmania* sp. foi a técnica mais sensível para o diagnóstico da LVC;
- O baço se mostrou o tecido com maior taxa de detecção de DNA do parasito;
- A carga parasitária do sangue não foi estatisticamente diferente do baço em animais oligo e polissintomáticos.

VII. DISCUSSÃO

A padronização do protocolo de cPCR na primeira parte do estudo, foi bem sucedida, com a técnica demonstrando elevada sensibilidade, evidenciada pelo baixo limiar de detecção (10 fg de DNA do parasito por amostra). Limiar de detecção que se revelou adequado também para o diagnóstico de cães assintomáticos. Além de elevada sensibilidade, outra vantagem do emprego da técnica molecular consiste na alta especificidade, atestada pela não amplificação de material genético de outros patógenos comuns nos cães como *E. canis*, *B. canis*, *T. gondii* e *T. cruzi*, que frequentemente ocasionam reações inespecíficas em testes sorológicos (ALVES e BEVILACQUA, 2004; FERREIRA *et al.*, 2007; TRONCARELLI *et al.*, 2009; FARIA *et al.*, 2011; MARCONDES *et al.*, 2011). Todavia, pela região do kDNA ser extremamente conservada em todas as espécies de *Leishmania* sp. o protocolo empregado falhou na discriminação entre *L. infantum*, *L. major* e *L. amazonensis* (SHELIN e RAY, 1989). Dessa forma, em áreas endêmicas para ambas as formas visceral e cutânea, torna-se necessária uma investigação molecular mais criteriosa dos animais para discriminação da espécie de *Leishmania* infectante (MARZOCHI *et al.*, 1985; MADEIRA *et al.*, 2006).

Em razão do controle da LVC no Brasil ser baseado principalmente na eutanásia de cães infectados, é de grande importância que a técnica diagnóstica utilizada para detecção dos cães positivos tenha alta sensibilidade, pois animais falso negativos, não removidos das áreas endêmicas, permitem a manutenção do ciclo de transmissão por albergarem o parasito (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001b; COURTENAY *et al.*, 2002). O teste também deve apresentar uma elevada especificidade, possibilitando a detecção do maior número de animais realmente infectados, evitando assim a eutanásia desnecessária de cães falso positivos (ALVAR *et al.*, 2004; TRONCARELLI *et al.*, 2009).

Em relação às diferentes técnicas avaliadas para o diagnóstico de infecção por *Leishmania* sp. na primeira parte do estudo, o ELISA detectou como positivos um maior número de cães em relação às outras técnicas, como a cPCR. É possível que a maior detecção esteja relacionada à ocorrência de reação cruzada com outros patógenos, frequente nos testes sorológicos (FERREIRA *et al.*, 2007). A cPCR por sua vez, apresentou sensibilidade mais elevada para detecção de DNA de *Leishmania* sp., comparada à qPCR. Essa maior sensibilidade pode ter ocorrido devido a presença de múltiplas cópias do kDNA no gênero

Leishmania, conferindo a esse alvo empregado pela cPCR uma sensibilidade maior do que outras regiões menos repetitivas como a SU rRNA, mesmo quando empregadas na técnica de qPCR (BASTIEN, PROCOP e REISCHL, 2008).

Na primeira parte do estudo, para o diagnóstico dos animais polissintomáticos, o emprego de um teste diagnóstico (sorológico ou molecular) foi suficiente. Estudos demonstraram que animais sintomáticos apresentam mais imunoglobulinas anti-*Leishmania* circulantes assim como parasitismo esplênico aumentado, elevando desta forma as chances destes cães serem detectados nos testes diagnósticos (LEANDRO *et al.*, 2001; DOS-SANTOS *et al.*, 2008). Também foi demonstrado que, cães apresentando sintomatologia característica de LVC, especialmente os casos clínicos mais graves, apresentam carga parasitária mais elevada em relação aos animais assintomáticos (RODRIGUEZ-CORTES *et al.*, 2007; MANNA *et al.*, 2009).

Diante dos promissores resultados apresentados pela cPCR tendo o kDNA como alvo, decidimos padronizar uma nova técnica de qPCR mantendo este alvo, para realizar a comparação entre os diferentes tecidos coletados, visando desta forma aumentar a sensibilidade do método diagnóstico. Assim, na segunda parte do estudo, o novo protocolo de qPCR foi empregado objetivando-se determinar qual o melhor tecido a ser empregado para o diagnóstico biomolecular da LVC, em cães com diferentes manifestações clínicas. Com esta finalidade analisamos a taxa de detecção do DNA do parasito em amostras de medula óssea, baço, sangue e linfonodo de cães naturalmente infectados.

A qPCR apresenta diferentes vantagens em relação à cPCR como menor risco de contaminação, maior praticidade, possibilidade da quantificação da carga parasitária dos animais, e possivelmente, empregando-se o kDNA como alvo, maior sensibilidade (MOREIRA *et al.*, 2007; MARTINEZ *et al.*, 2011). Nos últimos anos, vários métodos de qPCR foram desenvolvidos visando a detecção do parasita e o diagnóstico da LVC (MARY *et al.*, 2004; MANNA *et al.*, 2006; MAIA e CAMPINO, 2008). No entanto, devido às metodologias diferentes empregadas, e a falta de controle interno da reação, estes métodos apresentaram variações consideráveis, com resultados divergentes em relação ao emprego de diferentes amostras clínicas caninas.

Na segunda parte do estudo, além do controle de qualidade quanto a pureza e integridade do DNA extraído, foi aplicado também um controle interno da reação

(amplificação do gene constitutivo 18S) para avaliação da integridade do DNA de todas as amostras, com o intuito de excluir as que sofreram algum dano em sua obtenção ou extração do material genético, e desta forma, diminuir possíveis resultados falso negativos por falha de amplificação. De acordo com os critérios de seleção aplicados, excluímos 15% das amostras.

Os resultados da qPCR para detecção do DNA de *Leishmania* sp. foram analisados em relação aos resultados do gene constitutivo (18S), visando normalizar a quantificação da carga parasitária apresentada em cada tecido.

Os resultados de qPCR, com kDNA de *Leishmania* sp. como alvo, foram mais sensíveis, quando comparados ao exame sorológico e à cultura, na detecção da infecção pelo parasito. Uma melhor taxa de detecção foi encontrada também por Solano-Gallego *et al.* (2001) em um estudo na ilha de Majorca, onde a soroprevalência detectada foi de 26% nos cães avaliados, ao passo que, utilizando a técnica molecular em diferentes tecidos, 63% dos animais foram positivos para *L. infantum*. Leontides *et al.* (2002) também obtiveram resultados similares, detectando pela sorologia apenas 12,3% de cães como positivos, enquanto que pela técnica molecular foi identificada infecção por *Leishmania* sp. em 63% dos animais.

A combinação dos resultados obtidos nas duas partes do estudo apresentadas nessa dissertação, demonstraram que aspirado esplênico é um tecido adequado para ser empregado para o diagnóstico da infecção por *Leishmania* sp. (SOLCÀ *et al.*, 2012). Utilizando a qPCR na segunda parte do trabalho, o tecido esplênico além de apresentar maior taxa de positividade, apresentou também maior carga parasitária, quando comparado aos outros tecidos avaliados. Este fato pode ser explicado, pois este órgão é um local importante de interação entre o sistema imune e o parasito durante o curso da infecção (SANTANA *et al.*, 2008). Além disso, já foi demonstrado que o baço mantém a infecção do parasito durante todo o curso da LVC (REIS *et al.*, 2006).

Embora a taxa de positividade detectada no baço tenha sido maior que nos outros tecidos, a detecção de infecção no sangue não apresentou diferença estatística quando comparada ao baço. A taxa de positividade detectada no sangue foi maior do que no linfonodo e medula óssea, embora em relação à quantificação da carga parasitária, o sangue apresentou resultados menores quando comparado com as amostras dos outros tecidos. Diferente dos resultados aqui apresentados, vários estudos encontraram a medula óssea e linfonodos com

maior taxa de positividade em relação a detectada no sangue (FRANCINO *et al.*, 2006; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2007; MANNA *et al.*, 2008; MAIA *et al.*, 2010). Quaresma *et al.* (2009), por outro lado, encontrou taxas de positividade semelhantes em amostras de sangue e da medula óssea. A falha de detecção do DNA do parasito no sangue, podem ocorrer devido a alta frequência de inibidores de PCR encontrados na amostra, assim como a baixa carga parasitária, que pode levar a resultados falso negativos, possivelmente em cães assintomáticos. Pode-se apontar que o protocolo de qPCR utilizado neste estudo apresentou elevada especificidade e sensibilidade, sendo capaz de detectar as baixas cargas parasitárias presentes nas amostras de sangue. De acordo com nossos resultados, Francino *et al.* (2006) demonstraram que o sangue pode ser suficiente para o diagnóstico da infecção de *Leishmania* sp. pela qPCR devido à capacidade desta técnica de quantificar níveis extremamente baixos de parasitemia. Contudo, para validar o emprego dessa amostra, seria interessante testar a performance da amostra sanguínea utilizando-se o protocolo de qPCR tendo como alvo o kDNA para *Leishmania* sp. também em animais assintomáticos.

Em nosso estudo tentamos avaliar também se havia alguma diferença entre a carga parasitária encontrada em cães oligo e polissintomáticos. Alguns estudos demonstraram correlação entre as manifestações clínicas da LVC e a carga parasitária no baço e linfonodos (BARROUIN-MELO *et al.*, 2004; SANCHEZ *et al.*, 2004; MANNA *et al.*, 2009). Enquanto que, outros estudos ratificaram que as manifestações clínicas da LVC não necessariamente estão correlacionadas com a carga parasitária dos tecidos (ABRANCHES, CAMPINO e SANTOS-GOMES, 1998; TAFURI *et al.*, 2001). O presente estudo revelou que a carga parasitária entre cães oligossintomáticos e polissintomáticos não apresentou diferença estatisticamente significativa em cada um dos tecidos analisados. Embora, comparando diferentes tecidos, os cães oligossintomáticos tendem a ter uma maior carga de parasita no baço, quando comparado ao linfonodo e medula óssea. Cães polissintomáticos também tendem a apresentar uma maior carga parasitária no baço em relação ao linfonodo. Reis *et al.* (2006), encontraram correlação positiva entre carga parasitária no baço e pele de cães sintomáticos quando comparados com cães assintomáticos. Talvez, a nossa falha em detectar essa diferença é devida à ausência de cães assintomáticos na população do estudo aleatoriamente capturada para essa análise.

O fato que a detecção de DNA de *Leishmania* sp. no sangue pela qPCR não mostrou diferença estatística em relação ao baço, é um resultado promissor para que o sangue

possa ser empregado para detecção de infecção por *Leishmania* sp. em cães, uma vez que a coleta da amostra sanguínea é considerada menos invasiva quando comparada com a do baço. Contudo, em nossa experiência, a coleta de aspirado esplênico, é bem tolerada, mesmo nos cães mais severamente afetados. No entanto, este procedimento ainda é considerado invasivo, necessitando do uso de um aparelho de ultrassom que permite a correta visualização do órgão, para torná-lo mais seguro (CARVALHO *et al.*, 2009; WATSON *et al.*, 2011). Assim, a utilização da amostra sanguínea, quando comparada com a amostra esplênica, é mais aconselhada especialmente em avaliações epidemiológicas, por várias razões: sua coleta é menos invasiva, é mais fácil e rapidamente obtida, e o procedimento é menos caro e melhor aceito pelos donos de cães (AOUN *et al.*, 2009; MAIA *et al.*, 2009; DE ALMEIDA *et al.*, 2011; LOMBARDO *et al.*, 2012).

Em suma, os resultados da segunda parte do estudo aqui apresentados, mostraram que o baço é o tecido de maior taxa de detecção de DNA do parasito em cães naturalmente infectados. Todavia, a amostra de sangue por ser a segunda amostra de melhor detecção, e por necessitar uma coleta menos invasiva, foi considerada como uma amostra alternativa válida para a detecção do DNA de *Leishmania* sp. em cães sintomáticos, utilizando a qPCR.

VIII. CONCLUSÕES

- A cPCR de amostra de tecido esplênico se mostrou a técnica mais sensível para a detecção de infecção por *Leishmania* sp. em cães naturalmente infectados quando comparada com ELISA e cultura;
- O baço se mostrou como o tecido de maior taxa de detecção de DNA do parasito em cães naturalmente infectados, empregando-se a qPCR tendo como alvo o kDNA de *Leishmania* sp. como técnica diagnóstica.

XI. PERSPECTIVAS

- Realizar qPCR tendo como alvo o kDNA de *Leishmania* sp. em amostras de:
 - Pele
 - Pele com lesão
 - *Swab* conjuntival

- Avaliar a taxa de detecção das amostras de um grupo de animais assintomáticos;

- Avaliação estatística dos resultados e atualização do manuscrito;

- Publicação do trabalho.

BIBLIOGRAFIA

ABRANCHES, P.; CAMPINO, L.; SANTOS-GOMES, G. M. [Canine leishmaniasis. New concepts of epidemiology and immunopathology: their impact in the control of human visceral leishmaniasis]. **Acta medica portuguesa**, v. 11, n. 10, p. 871-5, Oct 1998.

ALEIXO, J. A.; NASCIMENTO, E. T.; MONTEIRO, G. R.; FERNANDES, M. Z.; RAMOS, A. M.; WILSON, M. E.; PEARSON, R. D.; JERONIMO, S. M. Atypical American visceral leishmaniasis caused by disseminated *Leishmania amazonensis* infection presenting with hepatitis and adenopathy. **Transaction of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 1, p. 79-82, Jan 2006.

ALEXANDER, J.; RUSSELL, D. G. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. **Advances in parasitology**, v. 31, p. 175-254, 1992.

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R.; RUSSELL, D. G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. **Journal of cell science**, v. 112 Pt 18, p. 2993-3002, Sep 1999.

ALMEIDA, M. A.; JESUS, E. E.; SOUSA-ATTA, M. L.; ALVES, L. C.; BERNE, M. E.; ATTA, A. M. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary parasitology**, v. 127, n. 3-4, p. 227-32, Feb 28 2005.

ALVAR, J.; CANAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Advances in parasitology**, v. 57, p. 1-88, 2004.

ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Cad. Saúde Pública**, v. 20, n. 1, p. 259-265, 2004.

ANTINORI, S.; CALATTINI, S.; LONGHI, E.; BESTETTI, G.; PIOLINI, R.; MAGNI, C.; ORLANDO, G.; GRAMICCIA, M.; ACQUAVIVA, V.; FOSCHI, A.; CORVASCE, S.; COLOMBA, C.; TITONE, L.; PARRAVICINI, C.; CASCIO, A.; CORBELLINO, M. Clinical use of polymerase chain reaction performed on peripheral blood and bone marrow samples for the diagnosis and monitoring of visceral leishmaniasis in HIV-infected and HIV-uninfected patients: a single-center, 8-year experience in Italy and review of the literature. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 44, n. 12, p. 1602-10, Jun 15 2007.

ANTOINE, J. C.; PRINA, E.; JOUANNE, C.; BONGRAND, P. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. **Infection and immunity**, v. 58, n. 3, p. 779-87, Mar 1990.

AOUN, O.; MARY, C.; ROQUEPLO, C.; MARIE, J. L.; TERRIER, O.; LEVIEUGE, A.; DAVOUST, B. Canine leishmaniasis in south-east of France: screening of *Leishmania infantum* antibodies (western blotting, ELISA) and parasitaemia levels by PCR quantification. **Veterinary parasitology**, v. 166, n. 1-2, p. 27-31, Dec 3 2009.

BANETH, G.; KOUTINAS, A. F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in parasitology**, v. 24, n. 7, p. 324-30, Jul 2008.

BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI JUNIOR, G.; MOMEN, H.; MCMAHON-PRATT, D.; RIBEIRO DE JESUS, A.; ALMEIDA, R.; BADARO, R.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E. M. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 44, n. 5, p. 536-46, May 1991.

BARROUIN-MELO, S. M.; LARANGEIRA, D. F.; DE ANDRADE FILHO, F. A.; TRIGO, J.; JULIAO, F. S.; FRANKE, C. R.; PALIS AGUIAR, P. H.; CONRADO DOS-SANTOS, W. L.; PONTES-DE-CARVALHO, L. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniosis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. **Vet J**, v. 171, n. 2, p. 331-9, Mar 2006.

BARROUIN-MELO, S. M.; LARANGEIRA, D. F.; TRIGO, J.; AGUIAR, P. H.; DOS-SANTOS, W. L.; PONTES-DE-CARVALHO, L. Comparison between splenic and lymph node aspirations as sampling methods for the parasitological detection of *Leishmania chagasi* infection in dogs. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 2, p. 195-7, Mar 2004.

BASTIEN, P.; PROCOP, G. W.; REISCHL, U. Quantitative real-time PCR is not more sensitive than "conventional" PCR. **Journal of clinical microbiology**, v. 46, n. 6, p. 1897-900, Jun 2008.

BENDERITTER, T.; CASANOVA, P.; NASHKIDACHVILI, L.; QUILICI, M. Glomerulonephritis in dogs with canine leishmaniasis. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 82, n. 4, p. 335-41, Aug 1988.

BEVILACQUA, P. D.; PAIXÃO, H. H.; MODENA, C. M.; CASTRO, M. C. P. S. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 53, n. 1, 2001.

BRASIL. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. EPIDEMIOLOGICA**, D. D. V. N. Brasília: Ministério da Saúde e Secretaria de Vigilância em Saúde 2006.

BRASIL. **Nota técnica conjunta nº01/2011**. MINISTÉRIO DA SAÚDE, S. D. V. E. S., DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA DAS DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS Brasília, DF 2011.

CABRAL, M.; O'GRADY, J.; ALEXANDER, J. Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. **Parasite immunology**, v. 14, n. 5, p. 531-9, Sep 1992.

CAMPINO, L.; SANTOS-GOMES, G.; RICA CAPELA, M. J.; CORTES, S.; ABRANCHES, P. Infectivity of promastigotes and amastigotes of *Leishmania infantum* in a canine model for leishmaniosis. **Veterinary parasitology**, v. 92, n. 4, p. 269-75, Oct 20 2000.

CARVALHO, D.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; BALDANI, C. D.; MACHADO, R. Z. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of IgM antibodies against *Leishmania chagasi* in dogs. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 29, n. 2, p. 120-124, 2009.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; LUNA, R. D.; GRADONI, L.; AMBROSIO, R.; CORTESE, L.; SCALONE, A.; PERSECHINO, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **The Veterinary record**, v. 141, n. 21, p. 539-43, Nov 22 1997.

CORTESE, L.; SICA, M.; PIANTEDOSI, D.; RUGGIERO, G.; PERO, M. E.; TERRAZZANO, G.; MASTELLONE, V.; CIARAMELLA, P. Secondary immune-mediated thrombocytopenia in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **The Veterinary record**, v. 164, n. 25, p. 778-82, Jun 20 2009.

COSTA, F. A.; GOTO, H.; SALDANHA, L. C.; SILVA, S. M.; SINHORINI, I. L.; SILVA, T. C.; GUERRA, J. L. Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. **Veterinary pathology**, v. 40, n. 6, p. 677-84, Nov 2003.

COSTA, M. M.; PENIDO, M.; DOS SANTOS, M. S.; DORO, D.; DE FREITAS, E.; MICHALICK, M. S.; GRIMALDI, G.; GAZZINELLI, R. T.; FERNANDES, A. P. Improved canine and human visceral leishmaniasis immunodiagnosis using combinations of synthetic peptides in enzyme-linked immunosorbent assay. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 5, p. e1622, May 2012.

COURA-VITAL, W.; MARQUES, M. J.; VELOSO, V. M.; ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D.; REIS, L. E.; BRAGA, S. L.; MORAIS, M. H.; REIS, A. B.; CARNEIRO, M. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 8, p. e1291, Aug 2011.

COURTENAY, O.; QUINNELL, R. J.; GARCEZ, L. M.; SHAW, J. J.; DYE, C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **The Journal of infectious diseases**, v. 186, n. 9, p. 1314-20, Nov 1 2002.

DA COSTA-VAL, A. P.; CAVALCANTI, R. R.; DE FIGUEIREDO GONTIJO, N.; MICHALICK, M. S.; ALEXANDER, B.; WILLIAMS, P.; MELO, M. N. Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. **Vet J**, v. 174, n. 3, p. 636-43, Nov 2007.

DA SILVA, E. S.; VAN DER MEIDE, W. F.; SCHOONE, G. J.; GONTIJO, C. M.; SCHALLIG, H. D.; BRAZIL, R. P. Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays. **Veterinary research communications**, v. 30, n. 6, p. 637-43, Aug 2006.

DA SILVA, R. M.; LAURENTI, M. D.; GOMES, A. D. C.; NOGUEIRA, Y. L. Análise TG-ROC de testes de imunofluorescência no diagnóstico de leishmaniose visceral canina. **Rev Saúde Pública**, v. 43, n. 6, p. 1044-53, 2009.

DE ALMEIDA, A. D. B.; SOUSA, V. R.; SORTE EDA, C.; FIGUEIREDO, F. B.; DE PAULA, D. A.; PIMENTEL, M. F.; DUTRA, V.; MADEIRA MDE, F. Use of parasitological culture to detect *Leishmania (Leishmania) chagasi* in naturally infected dogs. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 11, n. 12, p. 1555-60, Dec 2011.

DE ALMEIDA FERREIRA, S.; LEITE, R. S.; ITUASSU, L. T.; ALMEIDA, G. G.; SOUZA, D. M.; FUJIWARA, R. T.; DE ANDRADE, A. S.; MELO, M. N. Canine skin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of *Leishmania infantum* DNA in an endemic urban area in Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 4, p. e1596, Apr 2012.

DE LIMA, V. M.; FATTORI, K. R.; MICHELIN ADE, F.; DA SILVEIRA NETO, L.; VASCONCELOS RDE, O. Comparison between ELISA using total antigen and immunochromatography with antigen rK39 in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary parasitology**, v. 173, n. 3-4, p. 330-3, Oct 29 2010.

DESJEUX, P. Leishmaniasis. **Nature reviews. Microbiology**, v. 2, n. 9, p. 692, Sep 2004.

DOS-SANTOS, W. L.; JESUS, E. E.; PARANHOS-SILVA, M.; PEREIRA, A. M.; SANTOS, J. C.; BALEEIRO, C. O.; NASCIMENTO, E. G.; MOREIRA, E. D.; OLIVEIRA, G. G.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C. Associations among immunological, parasitological and clinical parameters in canine visceral leishmaniasis: Emaciation, spleen parasitism, specific antibodies and leishmanin skin test reaction. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 123, n. 3-4, p. 251-9, Jun 15 2008.

DOURADO, Z. F.; SILVA, H. D.; SILVEIRA-LACERDA, E. D. P.; GARCÍA-ZAPATA, M. T. A. Panorama histórico do diagnóstico Laboratorial da leishmaniose visceral até o surgimento dos testes imunocromatográficos (rk39). **Revista de Patologia Tropical**, v. 36, n. 3, p. 205-214, 2007.

FARIA, A. R.; COSTA, M. M.; GIUSTA, M. S.; GRIMALDI, G., JR.; PENIDO, M. L.; GAZZINELLI, R. T.; ANDRADE, H. M. High-throughput analysis of synthetic peptides for the immunodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 9, p. e1310, Sep 2011.

FERREIRA, E. D., C.; DE LANA, M.; CARNEIRO, M.; REIS, A. B.; PAES, D. V.; DA SILVA, E. S.; SCHALLIG, H.; GONTIJO, C. M. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. **Veterinary parasitology**, v. 146, n. 3-4, p. 235-41, May 31 2007.

FERRER, L.; RABANAL, R. M.; DOMINGO, M.; RAMOS, J. A.; FONDEVILA, D. Identification of *Leishmania donovani* amastigotes in canine tissues by immunoperoxidase staining. **Research in veterinary science**, v. 44, n. 2, p. 194-6, Mar 1988.

FISA, R.; RIERA, C.; GALLEGO, M.; MANUBENS, J.; PORTUS, M. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. **Veterinary parasitology**, v. 99, n. 2, p. 105-11, Aug 1 2001.

FRANCINO, O.; ALTET, L.; SANCHEZ-ROBERT, E.; RODRIGUEZ, A.; SOLANO-GALLEGO, L.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; SANCHEZ, A.; ROURA, X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary parasitology**, v. 137, n. 3-4, p. 214-21, Apr 30 2006.

GALLETTI, E.; BONILAURI, P.; BARDASI, L.; FONTANA, M. C.; RAMINI, M.; RENZI, M.; DOSA, G.; MERIALDI, G. Development of a minor groove binding probe based real-time PCR for the diagnosis and quantification of *Leishmania infantum* in dog specimens. **Research in veterinary science**, v. 91, n. 2, p. 243-5, Oct 2011.

GOMES, Y. M.; PAIVA CAVALCANTI, M.; LIRA, R. A.; ABATH, F. G.; ALVES, L. C. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. **Vet J**, v. 175, n. 1, p. 45-52, Jan 2008.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3rd. Edinburgh: Elsevier Saunders, 2006.

GRIMALDI, G., JR.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical microbiology reviews**, v. 6, n. 3, p. 230-50, Jul 1993.

GRIMALDI, G., JR.; TEVA, A.; FERREIRA, A. L.; DOS SANTOS, C. B.; PINTO, I. S.; DE-AZEVEDO, C. T.; FALQUETO, A. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP(R) CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 1, p. 54-9, Jan 2012.

KAR, K. Serodiagnosis of leishmaniasis. **Critical reviews in microbiology**, v. 21, n. 2, p. 123-52, 1995.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604-15, Aug 2011.

KILLICK KENDRICK, R.; RIOUX, J. A. Intravectorial cycle of *Leishmania* in sandflies. **Annales de parasitologie humaine et comparee**, v. 66 Suppl 1, p. 71-4, 1991.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. **Clinics in dermatology**, v. 17, n. 3, p. 279-89, May-Jun 1999.

KOUTINAS, A. F.; POLIZOPOULOU, Z. S.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; ARGYRIADIS, D.; FYTIANOU, A.; PLEVRAKI, K. G. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 35, n. 5, p. 376-83, Sep-Oct 1999.

KUHLS, K.; ALAM, M. Z.; CUPOLILLO, E.; FERREIRA, G. E.; MAURICIO, I. L.; ODDONE, R.; FELICIANGELI, M. D.; WIRTH, T.; MILES, M. A.; SCHONIAN, G. Comparative microsatellite typing of new world *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 6, p. e1155, Jun 2011.

LACHAUD, L.; CHABBERT, E.; DUBESSAY, P.; DEREURE, J.; LAMOTHE, J.; DEDET, J. P.; BASTIEN, P. Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. **Parasitology**, v. 125, n. Pt 3, p. 197-207, Sep 2002.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. **Nature**, v. 273, n. 5664, p. 595-600, Jun 22 1978.

LEANDRO, C.; SANTOS-GOMES, G. M.; CAMPINO, L.; ROMAO, P.; CORTES, S.; ROLAO, N.; GOMES-PEREIRA, S.; RICA CAPELA, M. J.; ABRANCHES, P. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniosis. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 79, n. 3-4, p. 273-84, May 30 2001.

LEITE, R. S.; FERREIRA SDE, A.; ITUASSU, L. T.; DE MELO, M. N.; DE ANDRADE, A. S. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. **Veterinary parasitology**, v. 170, n. 3-4, p. 201-6, Jun 24 2010.

LEMOS, E. M.; LAURENTI, M. D.; MOREIRA, M. A.; REIS, A. B.; GIUNCHETTI, R. C.; RAYCHAUDHURI, S.; DIETZE, R. Canine visceral leishmaniasis: performance of a rapid diagnostic test (Kalazar Detect) in dogs with and without signs of the disease. **Acta tropica**, v. 107, n. 2, p. 205-7, Aug 2008.

LEONTIDES, L. S.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; BILLINIS, C.; KONTOS, V.; KOUTINAS, A. F.; GALATOS, A. D.; MYLONAKIS, M. E. A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. **Veterinary parasitology**, v. 109, n. 1-2, p. 19-27, Oct 16 2002.

LÉVEILLÉ, R.; PARTINGTON, B. P.; BILLER, D. S.; MIYABAYASHI, T. Complications after ultrasound-guided biopsy of abdominal structures in dogs and cats: 246 cases (1984-1991). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 203, n. 3, p. 413-5, Aug 1 1993.

LOMBARDO, G.; PENNISI, M. G.; LUPO, T.; MIGLIAZZO, A.; CAPRI, A.; SOLANO-GALLEGO, L. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. **Veterinary parasitology**, v. 184, n. 1, p. 10-7, Feb 28 2012.

MADEIRA, M. F.; FIGUEIREDO, F. B.; PINTO, A. G.; NASCIMENTO, L. D.; FURTADO, M.; MOUTA-CONFORT, E.; DE PAULA, C. C.; BOGIO, A.; GOMES, M. C.; BESSA, A. M.; PASSOS, S. R. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: is intact skin a good target? **Research in veterinary science**, v. 87, n. 2, p. 260-2, Oct 2009.

MADEIRA, M. F.; SCHUBACH, A.; SCHUBACH, T. M.; PACHECO, R. S.; OLIVEIRA, F. S.; PEREIRA, S. A.; FIGUEIREDO, F. B.; BAPTISTA, C.; MARZOCHI, M. C. Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 5, p. 442-5, May 2006.

MAIA, C.; AFONSO, M. O.; NETO, L.; DIONISIO, L.; CAMPINO, L. Molecular detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Phlebotomus perniciosus* from Algarve region, Portugal. **Journal of vector borne diseases**, v. 46, n. 4, p. 268-72, Dec 2009.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary parasitology**, v. 158, n. 4, p. 274-87, Dec 20 2008.

MAIA, C.; NUNES, M.; CRISTOVAO, J.; CAMPINO, L. Experimental canine leishmaniasis: clinical, parasitological and serological follow-up. **Acta tropica**, v. 116, n. 3, p. 193-9, Dec 2010.

MAIA-ELKHOURY, A. N.; ALVES, W. A.; SOUSA-GOMES, M. L.; SENA, J. M.; LUNA, E. A. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cadernos de saude publica / Ministerio da Saude, Fundacao Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saude Publica**, v. 24, n. 12, p. 2941-7, Dec 2008.

MANCIANTI, F.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; PIERI, S. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 4, p. 566-7, 1988.

MANNA, L.; REALE, S.; VIOLA, E.; VITALE, F.; MANZILLO, V. F.; MICHELE, P. L.; CARACAPPA, S.; GRAVINO, A. E. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. **Veterinary parasitology**, v. 142, n. 3-4, p. 271-80, Dec 20 2006.

MANNA, L.; REALE, S.; VITALE, F.; GRAVINO, A. E. Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. **Research in veterinary science**, v. 87, n. 1, p. 76-8, Aug 2009.

MANNA, L.; REALE, S.; VITALE, F.; PICILLO, E.; PAVONE, L. M.; GRAVINO, A. E. Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. **Vet J**, v. 177, n. 2, p. 279-82, Aug 2008.

MANNA, L.; VITALE, F.; REALE, S.; CARACAPPA, S.; PAVONE, L. M.; MORTE, R. D.; CRINGOLI, G.; STAIANO, N.; GRAVINO, A. E. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. **Veterinary parasitology**, v. 125, n. 3-4, p. 251-62, Nov 10 2004.

MARCONDES, M.; BIONDO, A. W.; GOMES, A. A.; SILVA, A. R.; VIEIRA, R. F.; CAMACHO, A. A.; QUINN, J.; CHANDRASHEKAR, R. Validation of a *Leishmania infantum* ELISA rapid test for serological diagnosis of *Leishmania chagasi* in dogs. **Veterinary parasitology**, v. 175, n. 1-2, p. 15-9, Jan 10 2011.

MARGONARI, C.; FREITAS, C. R.; RIBEIRO, R. C.; MOURA, A. C.; TIMBO, M.; GRIPP, A. H.; PESSANHA, J. E.; DIAS, E. S. Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 31-8, Feb 2006.

MARTINEZ, V.; QUILEZ, J.; SANCHEZ, A.; ROURA, X.; FRANCINO, O.; ALTET, L. Canine leishmaniasis: the key points for qPCR result interpretation. **Parasites & vectors**, v. 4, p. 57, 2011.

MARY, C.; FARAUT, F.; LASCOMBE, L.; DUMON, H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 11, p. 5249-55, Nov 2004.

MARZOCHI, M. C.; COUTINHO, S. G.; DE SOUZA, W. J.; DE TOLEDO, L. M.; GRIMALDI JUNIOR, G.; MOMEN, H.; PACHECO RDA, S.; SABROZA, P. C.; DE SOUZA, M. A.; RANGEL JUNIOR, F. B.; ET AL. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 80, n. 3, p. 349-57, Jul-Sep 1985.

MAURICIO, I. L.; HOWARD, M. K.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, v. 119 (Pt 3), p. 237-46, Sep 1999.

MAURICIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitol Today**, v. 16, n. 5, p. 188-9, May 2000.

MENDONCA, L.; ALVES, L. C.; FAUSTINO, M. A. G.; VASCONCELOS, J. R. D. Clinical aspects of visceral leishmaniasis in naturally infected dogs in the city of Teresina, Piauí. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 8, n. 1, p. 23-25, 1999.

MICHALSKY, E. M.; ROCHA, M. F.; DA ROCHA LIMA, A. C.; FRANCA-SILVA, J. C.; PIRES, M. Q.; OLIVEIRA, F. S.; PACHECO, R. S.; DOS SANTOS, S. L.; BARATA, R. A.; ROMANHA, A. J.; FORTES-DIAS, C. L.; DIAS, E. S. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. **Veterinary parasitology**, v. 147, n. 1-2, p. 67-76, Jun 20 2007.

MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; OLIVA, G.; BANETH, G. Canine leishmaniosis--new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends in parasitology**, v. 24, n. 8, p. 371-7, Aug 2008.

MOHEBALI, M.; TARAN, M.; ZAREI, Z. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick rk39 test and direct agglutination. **Veterinary parasitology**, v. 121, n. 3-4, p. 239-45, May 26 2004.

MOLINA, R.; AMELA, C.; NIETO, J.; SAN-ANDRES, M.; GONZALEZ, F.; CASTILLO, J. A.; LUCIENTES, J.; ALVAR, J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 4, p. 491-3, Jul-Aug 1994.

MOLYNEUX, D. H.; ASHFORD, R. W. **The biology of *Trypanosoma* and *Leishmania***,

- parasites of man and domestic animals**. 4. John St, London: Taylor & Francis, Ltd, 1983.
- MONTEIRO, M. C.; NOGUEIRA, L. G.; ALMEIDA SOUZA, A. A.; RIBEIRO, J. M.; SILVA, J. S.; CUNHA, F. Q. Effect of salivary gland extract of *Leishmania* vector, *Lutzomyia longipalpis*, on leukocyte migration in OVA-induced immune peritonitis. **European journal of immunology**, v. 35, n. 8, p. 2424-33, Aug 2005.
- MOREIRA, M. A.; LUVIZOTTO, M. C.; GARCIA, J. F.; CORBETT, C. E.; LAURENTI, M. D. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary parasitology**, v. 145, n. 3-4, p. 245-52, Apr 30 2007.
- MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends in parasitology**, v. 18, n. 9, p. 399-405, Sep 2002.
- MORENO, J.; NIETO, J.; CHAMIZO, C.; GONZALEZ, F.; BLANCO, F.; BARKER, D. C.; ALVA, J. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 71, n. 3-4, p. 181-95, Nov 30 1999.
- NARANJO, C.; FONDEVILA, D.; ALTET, L.; FRANCINO, O.; RIOS, J.; ROURA, X.; PENA, T. Evaluation of the presence of *Leishmania* spp. by real-time PCR in the lacrimal glands of dogs with leishmaniosis. **Vet J**, Nov 11 2011.
- NDAO, M. Diagnosis of parasitic diseases: old and new approaches. **Interdisciplinary perspectives on infectious diseases**, v. 2009, p. 278246, 2009.
- NEVES, D. P. **Parasitologia Dinâmica**. 2. São Paulo: Atheneu, 2006.
- NOLAN, T. J.; HERMAN, R. Effects of long-term in vitro cultivation on *Leishmania donovani* promastigotes. **The Journal of protozoology**, v. 32, n. 1, p. 70-5, Feb 1985.
- OLIVA, G.; SCALONE, A.; FOGLIA MANZILLO, V.; GRAMICCIA, M.; PAGANO, A.; DI MUCCIO, T.; GRADONI, L. Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1318-22, Apr 2006.
- OLIVEIRA, C. D. L.; ASSUNÇÃO, R. M.; REIS, I. A.; PROIETTI, F. A. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais state, Brazil. **Cadernos de saude publica / Ministerio da Saude, Fundacao Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saude Publica**, v. 17, p. 1231-1239, 2001.
- ORDEIX, L.; SOLANO-GALLEGO, L.; FONDEVILA, D.; FERRER, L.; FONDATI, A. Papular dermatitis due to *Leishmania* spp. infection in dogs with parasite-specific cellular immune responses. **Veterinary dermatology**, v. 16, n. 3, p. 187-91, Jun 2005.
- PAIVA-CAVALCANTI, M.; REGIS-DA-SILVA, C. G.; GOMES, Y. M. Comparison of real-time PCR and conventional PCR for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection: a mini-review. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 16, n. 4, p. 537-542, 2010.

PALTRINIERI, S.; SOLANO-GALLEGO, L.; FONDATI, A.; LUBAS, G.; GRADONI, L.; CASTAGNARO, M.; CROTTI, A.; MAROLI, M.; OLIVA, G.; ROURA, X.; ZATELLI, A.; ZINI, E. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 236, n. 11, p. 1184-91, Jun 1 2010.

PENNISI, M. G.; REALE, S.; GIUDICE, S. L.; MASUCCI, M.; CARACAPPA, S.; VITALE, M.; VITALE, F. Real-time PCR in dogs treated for leishmaniasis with allopurinol. **Veterinary research communications**, v. 29 Suppl 2, p. 301-3, Aug 2005.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and immunity**, v. 62, n. 1, p. 229-35, Jan 1994.

PORROZZI, R.; SANTOS DA COSTA, M. V.; TEVA, A.; FALQUETO, A.; FERREIRA, A. L.; DOS SANTOS, C. D.; FERNANDES, A. P.; GAZZINELLI, R. T.; CAMPOS-NETO, A.; GRIMALDI, G., JR. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, v. 14, n. 5, p. 544-8, May 2007.

QUARESMA, P. F.; MURTA, S. M.; FERREIRA EDE, C.; DA ROCHA-LIMA, A. C.; XAVIER, A. A.; GONTIJO, C. M. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. **Acta tropica**, v. 111, n. 3, p. 289-94, Sep 2009.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O.; DAVIDSON, S.; GARCEZ, L.; LAMBSON, B.; RAMOS, P.; SHAW, J. J.; SHAW, M. A.; DYE, C. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. **Parasitology**, v. 122, n. Pt 3, p. 253-61, Mar 2001.

REALE, S.; MAXIA, L.; VITALE, F.; GLORIOSO, N. S.; CARACAPPA, S.; VESCO, G. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. **Journal of clinical microbiology**, v. 37, n. 9, p. 2931-5, Sep 1999.

REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARVALHO, M. G.; MAYRINK, W.; FRANCA-SILVA, J. C.; GIUNCHETTI, R. C.; GENARO, O.; CORREA-OLIVEIRA, R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in veterinary science**, v. 81, n. 1, p. 68-75, Aug 2006.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 1, p. 21-5, Jan 2007.

REY, L. **Parasitologia**. 4. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara & Koogan, 2008.

RHALEM, A.; SAHIBI, H.; LASRI, S.; JAFFE, C. L. Analysis of immune responses in dogs with canine visceral leishmaniasis before, and after, drug treatment. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 71, n. 1, p. 69-76, Oct 1 1999.

RODRIGUEZ-CORTES, A.; OJEDA, A.; LOPEZ-FUERTES, L.; TIMON, M.; ALTET, L.; SOLANO-GALLEGU, L.; SANCHEZ-ROBERT, E.; FRANCINO, O.; ALBEROLA, J. A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. **International journal for parasitology**, v. 37, n. 6, p. 683-93, May 2007.

ROLÃO, N.; CORTES, S.; RODRIGUES, O. R.; CAMPINO, L. Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by real-time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay. **The Journal of parasitology**, v. 90, n. 5, p. 1150-4, Oct 2004.

ROMICH, J. A. **Understanding Zoonotic Diseases**. 1. Delmar Cengage Learning, 2008.

RUSSELL, D. G.; WRIGHT, S. D. Complement receptor type 3 (CR3) binds to an Arg-Gly-Asp-containing region of the major surface glycoprotein, gp63, of *Leishmania* promastigotes. **The Journal of experimental medicine**, v. 168, n. 1, p. 279-92, Jul 1 1988.

SALDARRIAGA, O. A.; TRAVI, B. L.; PARK, W.; PEREZ, L. E.; MELBY, P. C. Immunogenicity of a multicomponent DNA vaccine against visceral leishmaniasis in dogs. **Vaccine**, v. 24, n. 11, p. 1928-40, Mar 10 2006.

SANCHEZ, M. A.; DIAZ, N. L.; ZERPA, O.; NEGRON, E.; CONVIT, J.; TAPIA, F. J. Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 70, n. 6, p. 618-24, Jun 2004.

SANTANA, C. C.; VASSALLO, J.; DE FREITAS, L. A.; OLIVEIRA, G. G.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; DOS-SANTOS, W. L. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs. **Parasite immunology**, v. 30, n. 10, p. 515-24, Oct 2008.

SARIDOMICHELAKIS, M. N. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniasis: epidemiologic and diagnostic implications. **Veterinary dermatology**, v. 20, n. 5-6, p. 471-89, Oct 2009.

SHAW, S. E.; LANGTON, D. A.; HILLMAN, T. J. Canine leishmaniasis in the United Kingdom: a zoonotic disease waiting for a vector? **Veterinary parasitology**, v. 163, n. 4, p. 281-5, Aug 26 2009.

SHELIN, C.; RAY, D. S. Specific discontinuities in *Leishmania tarentolae* minicircles map within universally conserved sequence blocks. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 37, n. 2, p. 151-7, Dec 1989.

SHERLOCK, I. A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 6, p. 671-83, Nov-Dec 1996.

SILVA, D. A.; MADEIRA, M. F.; TEIXEIRA, A. C.; DE SOUZA, C. M.; FIGUEIREDO, F. B. Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. **Veterinary parasitology**, v. 179, n. 1-3, p. 257-61, Jun 30 2011.

SINAN/SVS/MS. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2010. 2011

SINGH, S.; KUMARI, V.; SINGH, N. Predicting kala-azar disease manifestations in asymptomatic patients with latent *Leishmania donovani* infection by detection of antibody against recombinant K39 antigen. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 9, n. 3, p. 568-72, May 2002.

SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary parasitology**, v. 165, n. 1-2, p. 1-18, Oct 28 2009.

SOLANO-GALLEGO, L.; LLULL, J.; RAMOS, G.; RIERA, C.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. The Ibizian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania infection*. **Veterinary parasitology**, v. 90, n. 1-2, p. 37-45, Jun 10 2000.

SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G.; THE LEISHVET, G. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & vectors**, v. 4, p. 86, 2011.

SOLANO-GALLEGO, L.; MORELL, P.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 2, p. 560-3, Feb 2001a.

SOLANO-GALLEGO, L.; RIERA, C.; ROURA, X.; INIESTA, L.; GALLEGU, M.; VALLADARES, J. E.; FISA, R.; CASTILLEJO, S.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; ARBOIX, M.; PORTUS, M. *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. **Veterinary parasitology**, v. 96, n. 4, p. 265-76, Apr 19 2001b.

SOLANO-GALLEGO, L.; RODRIGUEZ-CORTES, A.; TROTTA, M.; ZAMPIERON, C.; RAZIA, L.; FURLANELLO, T.; CALDIN, M.; ROURA, X.; ALBEROLA, J. Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniosis. **Veterinary parasitology**, v. 147, n. 3-4, p. 315-9, Jul 20 2007.

SOLCÀ, M. D. S.; GUEDES, C. E.; NASCIMENTO, E. G.; OLIVEIRA, G. G.; DOS SANTOS, W. L.; FRAGA, D. B.; VERAS, P. S. Qualitative and quantitative polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Leishmania* in spleen samples from naturally infected dogs. **Veterinary parasitology**, v. 184, n. 2-4, p. 133-40, Mar 23 2012.

STRAUSS-AYALI, D.; JAFFE, C. L.; BURSHTAIN, O.; GONEN, L.; BANETH, G. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. **The Journal of infectious diseases**, v. 189, n. 9, p. 1729-33, May 1 2004.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 9, n. 5, p. 951-8, Sep 2002.

TAFURI, W. L.; DE OLIVEIRA, M. R.; MELO, M. N.; TAFURI, W. L. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 96, n. 3, p. 203-12, Apr 2 2001.

TALAMAS-ROHANA, P.; WRIGHT, S. D.; LENNARTZ, M. R.; RUSSELL, D. G. Lipophosphoglycan from *Leishmania mexicana* promastigotes binds to members of the CR3, p150,95 and LFA-1 family of leukocyte integrins. **J Immunol**, v. 144, n. 12, p. 4817-24, Jun 15 1990.

TRONCARELLI, M. Z.; CAMARGO, J. B.; MACHADO, J. G.; LUCHEIS, S. B.; LANGONI, H. *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. **Veterinary parasitology**, v. 164, n. 2-4, p. 118-23, Oct 14 2009.

TROPIA DE ABREU, R.; CARVALHO, M. G.; CARNEIRO, C. M.; GIUNCHETTI, R. C.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O. A.; COURA-VITAL, W.; CORREA-OLIVEIRA, R.; REIS, A. B. Influence of clinical status and parasite load on erythropoiesis and leucopoiesis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **PloS one**, v. 6, n. 5, p. e18873, 2011.

WATSON, A. T.; PENNINCK, D.; KNOLL, J. S.; KEATING, J. H.; SUTHERLAND-SMITH, J. Safety and correlation of test results of combined ultrasound-guided fine-needle aspiration and needle core biopsy of the canine spleen. **Veterinary radiology & ultrasound : the official journal of the American College of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association**, v. 52, n. 3, p. 317-22, May-Jun 2011.

WHO. **Weekly Epidemiological Record**. p.365–370. 2002

ANEXO (artigo científico)



Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](#)

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar



Short communication

Temporal distribution of positive results of tests for detecting *Leishmania* infection in stray dogs of an endemic area of visceral leishmaniasis in the Brazilian tropics: A 13 years survey and association with human disease

Deborah B.M. Fraga^{a,b}, Manuela S. Solcà^a, Virgínia M.G. Silva^{a,c}, Lairton S. Borja^a, Eliane G. Nascimento^d, Geraldo G.S. Oliveira^a, Lain C. Pontes-de-Carvalho^a, Patrícia S.T. Veras^a, Washington L.C. dos-Santos^{a,*}

^a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Rua Waldemar Falcão 121, Candeal, Salvador 40-296-710, BA, Brazil

^b Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária, Av. Adhemar de Barros, 500, Ondina, Salvador 40170-110, BA, Brazil

^c Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Rua José Moreira Sobrinho, s/n – Jequiezinho, Jequié 45200-000, BA, Brazil

^d Centro de Referência em Doenças Endêmicas Pirajá da Silva-PIEJ, CSU, URBIS 1, Rua 3s/n, Jequié 45200-000, BA, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 May 2012

Received in revised form 18 June 2012

Accepted 19 June 2012

Keywords:

Canine visceral leishmaniasis

Montenegro's skin test

Epidemiology

Leishmania infantum

Leishmania chagasi

ABSTRACT

Human visceral leishmaniasis occurs in periodic waves in endemic areas of Brazil. In this study we followed the prevalence of human visceral leishmaniasis and of *Leishmania infantum* infection in stray dogs of an endemic area of visceral leishmaniasis at periods of time between 1997 and 2010. Prevalence of human visceral leishmaniasis had two peaks (40 cases) in 1997 and 2006 with sharp declines to 2 cases in 2001 and to 5 cases in 2008. Similar fluctuations were also observed in the occurrence of positive spleen culture and anti-*Leishmania* serology in dogs, although the proportion of dogs with active spleen parasitism remained relatively high even in the periods of low prevalence of human disease. These observations support the notion that stray dogs may constitute a renewable source of parasites, capable of sustaining the persistence of the infection in urban areas, even in periods of low transmission by phlebotomines.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

Zoonotic visceral leishmaniasis is endemic in the American continent, in the Mediterranean basin and in some non-Mediterranean parts of Asia and Africa. Dogs are the main domestic reservoir of the parasite and a variety of phlebotomines such as *Lutzomyia longipalpis* (in the Americas), *Phlebotomus perniciosus* and *Phlebotomus ariasi* (in the Mediterranean basin) serve as vector of the disease

(Desjeux, 2001; Martin-Sanchez et al., 1994). A pattern of occurrence of human visceral leishmaniasis in periodic epidemic waves, spanning many years, has been observed in endemic areas of Brazil (Badaro et al., 1986; Franke et al., 2002; Sherlock, 1996). The reasons for such fluctuation in the incidence of human cases of the disease are poorly understood. However, climatic changes affecting the population dynamics of humans, animal hosts, and sand fly (phlebotomine) vectors has been reputed as a determining factor of the fluctuation in the number of human visceral leishmaniasis cases (Franke et al., 2002; Quinnell and Courtenay, 2009). In spite of this variation in the occurrence of the disease, the fact that periodical outbreaks of

* Corresponding author at: Rua Waldemar Falcão 121, Candeal, Salvador 40296-710, BA, Brazil. Tel.: +55 71 3176 2263; fax: +55 71 3176 2290.

E-mail address: wluis@bahia.fiocruz.br (W.L.C. dos-Santos).

human visceral leishmaniasis are observed in the same endemic area, suggests that the parasite is maintained in the endemic areas, even in periods in which human disease is nearly absent.

In this study we examined the distribution of outbreaks of human visceral leishmaniasis and the prevalence of *Leishmania infantum* (syn *Leishmania chagasi*) infection in dogs of a visceral leishmaniasis endemic area in the period between 1997 and 2010. The data on the tests performed upon the stray dog population was obtained from the records of a collaborative study carried out by the Gonçalo Moniz Research Center, FIOCRUZ, Municipality Zoonosis Control Services of Jequié and the Endemic Diseases Control Center Piraja da Silva – PIEJ (Jequié, BA, Brazil), aiming at different aspects of canine visceral leishmaniasis (Baleeiro et al., 2006; Dos-Santos et al., 2008; Paranhos-Silva et al., 2001). The stray dogs were collected from the streets of Jequié (an endemic area of visceral leishmaniasis in Bahia state, Brazil), and subjected to commonly used tests for detecting infection by *L. infantum*: ELISA, for detecting anti-*Leishmania* specific antibodies in the serum; culture of spleen aspirate for promastigote isolation; and leishmanin (Montenegro's) skin test (LST). The technical details of the anti-*Leishmania* ELISA, the LST and the splenic culture for *Leishmania* isolation have been reported elsewhere (Dos-Santos et al., 2008). Samples of the parasites isolated from the dogs were identified as *L. infantum*. Groups of 38–82 stray dogs were examined in each year of the study (Table 1). The data on human cases and domiciled dog serology were collected from the records of the PIEJ. Human diagnosis of visceral leishmaniasis was based on clinical and laboratorial signs of the disease and a positive ELISA. Estimate of domiciled dog infection was performed by immunofluorescence test using the IFI-leishmaniose canina-Bio-Manguinhos kit (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil), following the manufacturer's instructions.

During the period of the study, the number of human visceral leishmaniasis cases decreased from 40 in 1997 to 2 in 2001 and raised again to 35 cases in 2004, declining to 5 cases in 2008 (Table 1 and Fig. 1). In the same period, fluctuations were also observed in the prevalence of dogs with positive tests for *Leishmania* infection, with a decrease in the proportion of animals with evidence of infection (presenting with a positive ELISA, spleen culture or LST) from 66% in 1997 to 36% in 2001 reaching 87% in 2010 (Table 1). This data on the prevalence of positive tests in stray dogs was deeply influenced by the test used in the study. Nevertheless, even when only the spleen culture, the least sensitive test, is considered, the prevalence of infection in dogs remained high (31 ± 11%). Even in the period of lowest incidence of human cases (2001), 17% of the stray dogs had positive spleen cultures. These observations support the idea that dogs with active *L. infantum* infection maintain parasites in circulation within local host communities, even in periods of low transmission by phlebotomines. The high levels of active infection detected among the stray dog population may be related to: (1) continuous dog exposition to sandflies even under conditions of low density of this vector; (2) potential dissemination through non-usual vectors such as fleas; (3) direct transmission between dogs

Table 1
Distribution of human visceral leishmaniasis cases and positive cases of *L. infantum* infection in dogs using different laboratory tests.

Year	Stray dogs			Domiciled dogs			Human beings								
	Spleen culture			Immunofluorescence			VL cases								
	Ratio	(%)	[CI]	Ratio	(%)	[CI]	Ratio	(%)	[CI]	N	(^a)	[CI]			
1997	16/45	(36)	[21–50]	4/17	(24)	[1–46]	31/47	(66)	[52–80]	794/16558	(5)	[4.5–5.1]	40	(25)	[17–32]
1998	13/64	(20)	[10–30]	15/65	(23)	[13–34]	36/82	(44)	[36–59]	84/529	(16)	[12.8–19.0]	19	(11)	[7–17]
1999	12/34	(35)	[18–52]	15/38	(39)	[23–56]	24/38	(63)	[47–79]	218/15291	(1)	[1.2–1.6]	18	(10)	[6–16]
2000	7/39	(18)	[5–31]	3/39	(8)	[-1 to 16]	26/40	(65)	[50–80]	241/4463	(5)	[4.7–6.1]	8	(4)	[2–9]
2001	6/35	(17)	[4–30]	6/42	(14)	[3–25]	15/42	(36)	[21–51]	51/3357	(2)	[1.1–1.9]	2	(1)	[0–5]
2004	24/48	(50)	[35–65]	9/48	(19)	[7–30]	34/48	(71)	[58–84]	256/4063	(6)	[5.6–7.0]	35	(24)	[17–33]
2006	18/45	(40)	[25–55]	2/53	(4)	[-2 to 9]	32/53	(60)	[47–74]	945/5437	(17)	[16.4–18.4]	34	(23)	[16–32]
2008	19/53	(36)	[22–49]	5/55	(9)	[1–2]	44/56	(79)	[68–90]	505/5309	(10)	[8.7–10.3]	5	(3)	[1–8]
2010	18/58	(31)	[19–43]	ND	ND	ND	53/61	(87)	[78–96]	191/1185	(16)	[14.0–18.2]	15	(10)	[6–16]

Ratio, number of animals with positive test/total number of tested animals; CI, 95% confidence interval; LST, leishmanin skin test; VL, visceral leishmaniasis; N, number of cases.
^a Number of cases per 100,000 inhabitants.

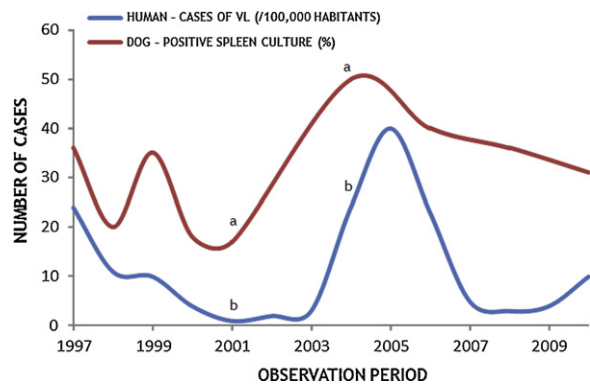


Fig. 1. Frequency of human cases of visceral leishmaniasis and of positive spleen culture for *Leishmania* in dogs from Jequié, BA, Brazil, in the period between 1997 and 2010. The characters a and b indicates time points with significantly different prevalence of positive spleen culture in dogs (a, 95% confidence interval of 4–30 in 2001 and 35–65 in 2004) or human cases of visceral leishmaniasis (b, 95% confidence interval of 0–5 in 2001 and 17–33 in 2004).

through wounds or secretion contacts during fights and sexual intercourse, both usual in the packs of stray dogs; (4) factors, such as malnutrition and co-infections, potentially leading to progression of previously controlled infection in some animals, as observed in other species (Enserink, 2000; Ferreira et al., 2009; Quinnell and Courtenay, 2009). In fact, the results for different tests used to assess *Leishmania* infection in dogs in this study depends upon the stage of infection and susceptibility/resistance of the animals to the development of visceral leishmaniasis (Cardoso et al., 2007; Dos-Santos et al., 2008; Paranhos-Silva et al., 2003; Santana et al., 2008). For instance, discrepancies are expected when the results of the LST, which may reflect some level of resistance to the development of disease, is compared with positive spleen culture which reflects an active infection (Dos-Santos et al., 2008; Santana et al., 2008).

It is noteworthy the similarity between the shape of the curves that represent the frequencies of human cases of visceral leishmaniasis and that of the positivity in culture of dog spleen aspirates (Fig. 1). Parasite detection in internal organs (spleen, liver or bone marrow) is associated with active parasitism and high parasite burden, both associated with disease (Paranhos-Silva et al., 2003; Reis et al., 2006). Hence such similarity in curve shapes of the frequency in human disease and active parasitism in dogs suggest the effect of a possible environmental factor, such as a high density of infected phlebotomines, determining the outburst of disease in both species.

It would be interesting to compare the infection rate between housed and stray dogs in an endemic area. In the time period of this report, however, this was not done in this work, as the infection rates for housed dogs, which were far lower than that for the stray dogs (Table 1), were determined by immunofluorescence and not by ELISA (as was done for the stray dogs). Although it have been shown that immunofluorescence is less sensitive than ELISA in the detection of *Leishmania* infection, it is interesting to notice that even the estimate of stray dog infection based on spleen culture, which is considered less sensitive than the immunofluorescence test, showed a high proportion

of infection among stray dogs in the whole period of the study. One cannot, therefore, exclude the possibility that, in comparison to housed dogs, stray dogs are more exposed to infection and to factors that determine the emergence of visceral leishmaniasis and/or positive spleen or skin parasitisms. In this case, such a population of stray dogs, frequent in most endemic areas of Brazil, may constitute a renewable source of parasites, capable of sustaining the persistence of the infection in urban areas, even in periods of low transmission by phlebotomines.

Ethics statement

All procedures involving animals were conducted in accordance with Brazilian Federal Law on Animal Experimentation (Law 11794) (http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato20072010/2008/lei/l11794.htm), with the Oswaldo Cruz Foundation guidelines for research with animals (<http://sistemas.cpqam.fiocruz.br/ceua/hiceuaw000.aspx>) and with the manual for the surveillance and control of visceral leishmaniasis. This study was approved by the institutional ethics committee for the use of animals in research (CPqGM-FIOCRUZ, CEUA, license No. 040/2005).

Acknowledgements

We thank Dr. Maria Conceição Chagas for her assistance in the statistical analysis and representation of the data presented in the manuscript. This work was supported by the Fundação Oswaldo Cruz grant PAPES-V 403470/2008-0, FAPESB grant APRO434/2005 and the Brazilian National Research Council – CNPq grant 302096/2009-4.

References

- Badaro, R., Jones, T.C., Lorenco, R., Cerf, B.J., Sampaio, D., Carvalho, E.M., Rocha, H., Teixeira, R., Johnson Jr., W.D., 1986. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *J. Infect. Dis.* 154, 639–649.
- Baleeiro, C.O., Paranhos-Silva, M., Dos Santos, J.C., Oliveira, G.G., Nascimento, E.G., de Carvalho, L.P., Dos-Santos, W.L., 2006. Montenegro's skin reactions and antibodies against different *Leishmania* species in dogs from a visceral leishmaniasis endemic area. *Vet. Parasitol.* 139, 21–28.
- Cardoso, L., Schallig, H.D., Cordeiro-da-Silva, A., Cabral, M., Alunda, J.M., Rodrigues, M., 2007. Anti-*Leishmania* humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 117, 35–41.
- Desjeux, P., 2001. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 95, 239–243.
- Dos-Santos, W.L., Jesus, E.E., Paranhos-Silva, M., Pereira, A.M., Santos, J.C., Baleeiro, C.O., Nascimento, E.G., Moreira, E.D., Oliveira, G.G., Pontes-de-Carvalho, L.C., 2008. Associations among immunological, parasitological and clinical parameters in canine visceral leishmaniasis: emaciation, spleen parasitism, specific antibodies and leishmanin skin test reaction. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 123, 251–259.
- Enserink, M., 2000. Infectious diseases Has leishmaniasis become endemic in the U.S.? *Science* 290, 1881–1883.
- Ferreira, M.G., Fattori, K.R., Souza, F., Lima, V.M., 2009. Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. *Vet. Parasitol.* 165, 150–154.
- Franke, C.R., Ziller, M., Staubach, C., Latif, M., 2002. Impact of the El Niño/Southern Oscillation on visceral leishmaniasis, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 914–917.
- Martin-Sanchez, J., Guilvard, E., Acedo-Sanchez, C., Wolf-Echeverri, M., Sanchez-Marin, M.C., Morillas-Marquez, F., 1994. *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, infection by various zymodemes of the *Leishmania infantum* complex in the Granada province (southern Spain). *Int. J. Parasitol.* 24, 405–408.

- Paranhos-Silva, M., Oliveira, G.G., Reis, E.A., de Menezes, R.M., Fernandes, O., Sherlock, I., Gomes, R.B., Pontes-de-Carvalho, L.C., dos-Santos, W.L., 2003. A follow-up of Beagle dogs intradermally infected with *Leishmania chagasi* in the presence or absence of sand fly saliva. *Vet. Parasitol.* 114, 97–111.
- Paranhos-Silva, M., Pontes-de-Carvalho, L.C., de Sa Oliveira, G.G., Nascimento, E.G., dos-Santos, W.L., 2001. Skin reactions to thimerosal and *Leishmania* in dogs from a leishmaniasis endemic area: it is better to keep them apart. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96, 679–681.
- Quinnell, R.J., Courtenay, O., 2009. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology* 136, 1915–1934.
- Reis, A.B., Teixeira-Carvalho, A., Vale, A.M., Marques, M.J., Giunchetti, R.C., Mayrink, W., Guerra, L.L., Andrade, R.A., Correa-Oliveira, R., Martins-Filho, O.A., 2006. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 112, 102–116.
- Santana, C.C., Vassallo, J., de Freitas, L.A., Oliveira, G.G., Pontes-de-Carvalho, L.C., dos-Santos, W.L., 2008. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs. *Parasite Immunol.* 30, 515–524.
- Sherlock, I.A., 1996. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 91, 671–683.